

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ імені ІГОРЯ
СІКОРСЬКОГО»**

**Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоінформатики**

«На правах рукопису»

УДК 573.6.086.83

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

_____ С.В. Горобець

«__» _____ 20__ р.

**Магістерська дисертація
на здобуття ступеня магістра
зі спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія»**

**на тему: « Біотехнологія створення системи адресної доставки
лікарських засобів на основі бактерій *Escherichia coli* Nissle 1917 для
терапії раку »**

Виконала

студентка VI курсу, групи БМ-81мп

Міленко Юлія Вікторівна

Науковий керівник:

зав. каф. біоінформатики, д.т.н., професор

Горобець Світлана Василівна

Консультант з експериментальної частини:

д.ф-м.н., професор Горобець Оксана Юріївна

Консультант з розробки стартап проекту:

к.е.н., доцент Ткаченко Т.П.

Рецензент:

зав. лаб. нанокристалічних структур

Інституту магнетизму НАН України та МОН України

к.ф-м.н. Дереча Дмитро Олександрович

Засвідчую, що у цій дипломній роботі
немає запозичень з праць інших авторів
без відповідних посилань.

Студентка Міленко Ю.В. _____

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоінформатики

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ С.В. Горобець

«__» _____ 20__ р.

ЗАВДАННЯ

на магістерську дисертацію студенту

Міленко Юлії Вікторівні

1. Тема дисертації «Біотехнологія створення системи адресної доставки лікарських засобів на основі бактерій *Escherichia coli* Nissle 1917 для терапії раку», науковий керівник дисертації Горобець Світлана Василівна, зав. каф. біоінформатики, д.т.н., професор

затверджені наказом по університету від «7» листопада 2019 р. №3585-с

2. Термін подання студентом дисертації 04 грудня 2019 р.

3. Об'єкт дослідження – магнітні властивості бактерій-процентів БМН *Escherichia coli* Nissle 1917 та їх практичне застосування для адресної доставки протиракових лікарських засобів.

4. Предмет дослідження – процес біомінералізації біогенних магнітних наночастинок (БМН) у *Escherichia coli* Nissle 1917 та можливість посилення магнітних властивостей *E. coli* Nissle 1917, як продуцента БМН, за допомогою використання хелату заліза та магнітного поля, застосування цього штаму для створення магніточутливої системи адресної доставки лікарських засобів для терапії раку.

5. Перелік завдань, які потрібно зробити: провести біоінформаційний аналіз протеомів бактерій, що накопичуються у пухлинах, на предмет здатності до утворення БМН; визначити продуцентів БМН серед пробіотичних бактерій; дослідити накопичення БМН у штаму *E.coli* Nissle 1917 методами атомно-силової та магнітно-силової мікроскопії, дослідити вплив хелату заліза та магнітного поля на процеси біомінералізації та росту у *E.coli* Nissle 1917; синтезувати ліпосоми та прикріпити їх до бактеріальних клітин у якості мікроконтейнерів для лікарських засобів.

6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу: презентація.

7. Орієнтовний перелік публікацій:

1. Міленко Ю.В. Потенційні продуценти біогенних магнітних наночастинок серед симбіотичних бактерій людського організму / Ю.В. Міленко // «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції (Київ, 19 квітня 2019) [Електронне видання] / Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2019. – 165 с.

2. Міленко Ю.В. Вплив хелату заліза і зовнішнього магнітного поля на інтенсивність процесів біомінералізації та росту у *Escherichia coli* Nissle 1917 / Ю.В. Міленко // Майбутній науковець – 2019 : матеріали всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю Ч. I (м. Сєвєродонецьк., 12 груд. 2019 р.) / укладач В. Ю. Тарасов – Сєвєродонецьк : Східноукр. нац. ун-т ім. В. Даля, 2019. – 282 с.

3. Міленко Ю.В. Можливість застосування бактерій-продуцентів БМН у системах адресної доставки ліків для терапії раку / Ю.В. Міленко // Майбутній науковець – 2019 : матеріали всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю Ч. I (м. Сєвєродонецьк., 12 груд. 2019 р.) / укладач В. Ю. Тарасов – Сєвєродонецьк : Східноукр. нац. ун-т ім. В. Даля, 2019. – 282 с.

8. Консультанти розділів дисертації

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Експериментальна частина	Горобець О.Ю., д.ф-м.н., професор		
Розроблення стартап проекту	Ткаченко Т.П., к.е.н, доцент		

9. Дата видачі завдання 3 вересня 2019 р.

10. Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1.	Визначення предмету дослідження	02.09.2019-04.09.2019	виконано
2.	Характеристика об'єкту дослідження	05.09.2019-09.09.2019	виконано
3.	Огляд літератури	10.09.2019-30.09.2019	виконано
4.	Визначення матеріалів і методів дослідження	05.09.2019-09.09.2019	виконано
5.	Виконання експериментальної частини	04.09.2019-27.10.2019	виконано
6.	Аналіз отриманих результатів	28.10.2019-05.11.2019	виконано
7.	Розроблення стартап проекту	06.11.2019-20.11.2019	виконано
8.	Оформлення магістерської дисертації	05.11.2019-02.12.2019	виконано

Студентка

Науковий керівник дисертації

(підпис)

(підпис)

Ю.В. Міленко

(ініціали, прізвище)

С.В. Горобець

(ініціали, прізвище)

РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація містить 110 сторінок, 34 таблиці, 21 рисунок, перелік посилань з 76 найменувань.

Мета даного дослідження – створити систему адресної доставки лікарських засобів для терапії раку на основі пробіотичної бактерії – продуцента БМН *Escherichia coli* Nissle 1917.

Об’єкт дослідження – магнітні властивості бактерій-продуцентів БМН *Escherichia coli* Nissle 1917 та їх практичне застосування для адресної доставки протиракових лікарських засобів.

Предмет дослідження – процес біомінералізації біогенних магнітних наночастинок (БМН) у *Escherichia coli* Nissle 1917 та можливість посилення магнітних властивостей *E. coli* Nissle 1917, як продуцента БМН, за допомогою використання хелату заліза та магнітного поля, застосування цього штаму для створення магніточутливої системи адресної доставки лікарських засобів для терапії раку.

Методи дослідження: біоінформаційний аналіз, атомно-силова та магнітно-силова мікроскопія, аналіз із застосуванням системи двох постійних магнітів, аналіз та візуалізація даних у програмі «Gwyddion».

У роботі було проведено біоінформаційний аналіз протеомів бактерій, що накопичуються у пухлинах, на предмет здатності до утворення БМН. Визначено продуцентів БМН серед пробіотичних бактерій і досліджено накопичення БМН у штаму *E.coli* Nissle 1917 методами атомно-силової та магнітно-силової мікроскопії. Досліджено вплив хелату заліза та магнітного поля на процеси біомінералізації та росту у *E.coli* Nissle 1917. Синтезовано ліпосоми та прикріплено їх до бактеріальних клітин у якості мікроконтейнерів для лікарських засобів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: БІОМІНЕРАЛІЗАЦІЯ, БІОГЕННІ МАГНІТНІ НАНОЧАСТИНКИ, БАКТЕРІАЛЬНА КОЛОНІЗАЦІЯ ПУХЛИН, СИСТЕМА АДРЕСНОЇ ДОСТАВКИ ЛІКІВ, ПРОБІОТИЧНІ БАКТЕРІЇ, ЛІПОСОМИ, МАГНІТОФОРЕТИЧНА РУХЛИВІСТЬ, ТЕРАПІЯ РАКУ.

ABSTRACT

The master's thesis contains 110 pages, 34 tables, 21 figures, 76 references.

The purpose of this study is to create the drug delivery system for cancer therapy based on the probiotic bacteria *Escherichia coli* Nissle 1917.

The object of the study is magnetic properties of BMN-producing bacteria *Escherichia coli* Nissle 1917 and its practical application for delivery of anticancer drugs to tumor tissues.

The subject of the study is the process of biomineralization of biogenic magnetic nanoparticles (BMN) in *Escherichia coli* Nissle 1917 and the possibility of increasing the magnetic properties of *E. coli* Nissle 1917, as a producer of BMN, by using iron chelate and magnetic field, and the use of this strain to create a magnetosensitive drug delivery system for cancer treatment.

Research methods: bioinformatic analysis, atomic force and magnetic force microscopy, analysis using a system of two permanent magnets, analysis and data visualization with the program «Gwyddion».

The bioinformatic analysis of the ability to form BMN of the bacteria that accumulate in the tumors was carried out in the work. BMN producers have been identified among probiotic bacteria and the BMN-producing strain *E. coli* Nissle 1917 has been investigated by atomic force and magnetic force microscopy. Influence of iron chelate and magnetic field on biomineralization and growth processes in *E. coli* Nissle 1917 also was investigated. Liposomes were synthesized and attached to bacterial cells as microcontainers for drugs.

KEYWORDS: BIOMINERALIZATION, BIOGENIC MAGNETIC NANOPARTICLES, BACTERIAL COLONIZATION OF TUMORS, DRUG DELIVERY SYSTEMS, PROBIOTIC BACTERIA, LIPOSOMES, MAGNETOPHORETIC MOBILITY, CANCER THERAPY.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	9
ВСТУП.....	10
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	13
1.1 Методи терапії раку.....	13
1.1.1 Системи адресної доставки лікарських засобів (ЛЗ) у терапії ракових пухлин.....	16
1.2 Бактеріальна колонізація пухлин	19
1.3 Біогенні магнітні наночастинки (БМН) у пухлинних клітинах.....	21
1.4 Механізм біомінералізації БМН.....	22
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	27
2.1 Обладнання та реактиви.....	27
2.2 Методи досліджень.....	28
2.2.1 Метод попарного вирівнювання амінокислотних послідовностей у програмі «BLAST».....	28
2.2.2 Атомно-силова та магнітно-силова мікроскопія.....	30
2.2.3 Аналіз з застосуванням системи двох постійних магнітів....	31
2.2.4 Аналіз та візуалізація даних у програмі «Gwyddion».....	32
2.2.5 Синтез ліпосом.....	33
2.2.6 Прикріплення ліпосом до поверхні бактеріальних клітин...	34
3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	37
3.1 Виявлення продуцентів БМН серед бактерій, які характеризуються пухлино-специфічним накопиченням.....	37
3.2 Визначення критеріїв вибору бактеріального штаму для створення системи адресної доставки	41
3.3 Біоінформаційний пошук продуцентів БМН серед пробіотичних бактерій та вибір штаму для створення системи адресної доставки.....	42

3.4 Експериментальне визначення наявності БМН у клітинах <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917.....	44
3.5 Дослідження впливу середовища з хелатом заліза та зовнішнього магнітного поля на посилення магнітних властивостей <i>E.coli</i> Nissle 1917 як бактерії-продуцента БМН.....	45
3.6 Дослідження впливу середовища з хелатом заліза та зовнішнього магнітного поля на інтенсивність росту <i>E.coli</i> Nissle 1917 як бактерії-продуцента БМН.....	53
3.7 Використання ліпосом у якості мікроконтейнерів для ЛЗ у системі адресної доставки на основі бактерії <i>E.coli</i> Nissle 1917.....	55
4 РОЗРОБКА СТАРТАП ПРОЕКТУ.....	59
4.1 Резюме	59
4.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартап-проекту. Ключові фактори успіху.....	64
4.3. Визначення ключових факторів успіху проекту.....	73
4.4. Визначення потенційних споживачів.....	76
4.5. Ціна інноваційної пропозиції на ринку.....	80
4.6. Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту.....	82
4.7. Ризики стартап-проекту та методи управління ними.....	87
ВИСНОВКИ.....	95
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	96

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БМН – біогенні магнітні наночастинки;

ЦПМ – цитоплазматична мембрана;

NCBI – National Center for Biotechnology Information;

BLAST – basic local alignment search tool;

АСМ – атомно-силова мікроскопія;

МСМ – магнітно-силова мікроскопія;

МП – магнітне поле;

ЛЗ – лікарський засіб;

PBS – натрій-фосфатний буфер;

МПА – м'ясо-пептонний агар;

МПБ – м'ясо-пептонний бульйон;

МТБ – магнітотаксисна бактерія;

ВГМП – високо градієнтне магнітне поле.

EPR-ефект – ефект посиленого проникнення та утримування (англ. enhanced permeability and retention effect).

ВСТУП

Актуальність

Методи терапії раку, що застосовуються у клінічній практиці, часто є недостатньо ефективними та викликають сильні побічні ефекти. У зв'язку з цим перспективною вважається розробка методів спрямованої (адресної) терапії. На сьогодні було створено технології синтезу різних систем адресної доставки лікарських засобів. Переважно їх дія ґрунтується на пасивному транспорті до пухлин хіміопрепаратів, заключених в наноконтейнери, або специфічному розпізнаванні рецепторів на поверхні ракових клітин за допомогою лігандів та моноклональних антитіл. Обидва методи мають свої недоліки і, крім, того не завжди вирішують проблеми стійкості до хіміотерапії внутрішніх гіпоксичних ділянок.

Дедалі частіше розглядається можливість застосування для терапії раку бактерій, що здатні до специфічного накопичення в пухлинах. Механізм бактеріальної колонізації зазвичай пояснюється гіпоксією внутрішніх ділянок пухлин, наявністю хіміотатрактантних сполук в областях некрозу та дезорганізованою структурою. Однак більшість дослідників схиляється до думки, що даний перелік факторів бактеріальної колонізації не є вичерпним і, можливо існують навіть більш значимі фактори.

Зважаючи на те, що у пухлинних клітин було виявлено властивість посиленого синтезу біогенних магнітних наночастинок (БМН), можливо роль у бактеріальній колонізації відіграють сили магнітодипольної взаємодії між БМН пухлинних та БМН бактеріальних клітин.

Застосування бактерій – продуцентів БМН для створення систем адресної доставки виправдане також і тим, що наявність біогенних магнітних наночастинок у бактерій дозволяє локалізувати їх у пухлині та керувати траєкторією руху клітин за допомогою зовнішнього магнітного поля.

Мета даної роботи – створення системи адресної доставки лікарських засобів для терапії раку на основі пробіотичної бактерії – продуцента БМН *Escherichia coli* Nissle 1917.

Завдання:

1. Методами порівняльної геноміки визначити здатність до синтезу БМН у бактерій, для яких було доведено пухлино-специфічне накопичення.
2. Методами порівняльної геноміки виявити серед пробіотичних бактерій такі, що є потенційними продуцентами БМН.
3. Експериментально визначити наявність БМН у клітинах *Escherichia coli* Nissle 1917.
4. Дослідити вплив хелату заліза та зовнішнього магнітного поля на посилення магнітних властивостей *Escherichia coli* Nissle 1917.
5. Створити магнітокеровану систему адресної доставки ліків на основі *Escherichia coli* Nissle 1917.
6. Розробити стартап-проект.

Предмет дослідження:

- геноми і протеоми штамів бактерій, що виявляють здатність до колонізації пухлин;
- геноми і протеоми штаму магнітотаксисних бактерій (МТБ) *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1;
- геноми і протеоми штамів пробіотичних бактерій;
- бактеріальна суспензія *Escherichia coli* Nissle 1917 (пробіотичний препарат «Мутафлор»).

Об'єкт дослідження:

- Магнітні властивості бактерій-продуцентів БМН *Escherichia coli* Nissle 1917 та їх практичне застосування для адресної доставки протиракових лікарських засобів.

Наукова новизна:

- Вперше методами порівняльної геноміки показано роль, що накопичення бактеріальних клітин в пухлинах може бути обумовлено магнітодипольною взаємодією між БМН бактеріальних та пухлинних клітин.
- Вперше експериментально виявлено наявність БМН у *Escherichia coli* Nissle 1917.
- Вперше створено магнітокеровану систему адресної доставки ліків на основі пробіотичного штаму *Escherichia coli* Nissle 1917.

Апробація:

1. Міленко Ю.В. Потенційні продуценти біогенних магнітних наночастинок серед симбіотичних бактерій людського організму / Ю.В. Міленко // «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції (Київ, 19 квітня 2019) [Електронне видання] / Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2019. – 165 с.

2. Міленко Ю.В. Вплив хелату заліза і зовнішнього магнітного поля на інтенсивність процесів біомінералізації та росту у *Escherichia coli* Nissle 1917 / Ю.В. Міленко // Майбутній науковець – 2019 : матеріали всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю Ч. I (м. Северодонецьк., 12 груд. 2019 р.) / укладач В. Ю. Тарасов – Северодонецьк : Східноукр. нац. ун-т ім. В. Даля, 2019. – 282 с.

3. Міленко Ю.В. Можливість застосування бактерій-продуцентів БМН у системах адресної доставки ліків для терапії раку / Ю.В. Міленко // Майбутній науковець – 2019 : матеріали всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю Ч. I (м. Северодонецьк., 12 груд. 2019 р.) / укладач В. Ю. Тарасов – Северодонецьк : Східноукр. нац. ун-т ім. В. Даля, 2019. – 282 с.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1. 1 Методи терапії раку

Основні напрями терапії раку, що застосовуються на сьогодні у клінічній практиці включають хірургію, хіміотерапію, променеву терапію, гормональну терапію та імунотерапію.

Хірургічне лікування раку є одним з найдавніших методів, згадки про нього відносяться ще до часів Стародавнього Єгипту. Теоретично пухлинні форми раку можна вилікувати, якщо їх повністю видалити хірургічним шляхом, але це не завжди можливо. Якщо до операції відбулося метастазування раку до інших ділянок в організмі, повне хірургічне висічення, як правило, є неможливим. Навіть одна ракова клітина, невидима неозброєним оком для хірурга, може перерости в нову пухлину і спричинити повторний процес, який називається рецидивом. Тому хірургічне втручання проводиться в комплексі з іншими формами лікування. Приклади хірургічних процедур раку включають мастектомію раку молочної залози, простатектомію раку передміхурової залози та операцію на раку легенів для недрібноклітинного раку легені. Метою операції може бути або видалення лише пухлини, або всього органу [Subotic *European Urology Supplements* 2012].

Променева терапія використовує іонізуюче випромінювання для знищення ракових клітин шляхом пошкодження їх генетичного матеріалу. Метод ґрунтується на тому, що ракові клітини ростуть і діляться швидше, ніж нормальні клітини, а отже їх генетичний апарат є більш вразливим до дії вільних радикалів, що утворюються всередині клітини при опроміненні [Maverakis *Acta Derm Venereol* 2015]. Променева терапія може використовуватися для лікування майже всіх типів солідної пухлини, а також для лікування лейкемії та лімфоми. Однак ефективність лікування обмежена лише регіоном, на який спрямовується випромінювання. Доза

опромінення для кожної частини тіла залежить від ряду факторів, включаючи радіочутливість кожного типу раку та наявність поруч тканин та органів, які можуть бути пошкоджені радіацією. Променева терапія не може застосовуватися, якщо пухлина розташована у вразливих місцях та є малоефективною на пізніх стадіях. Крім того, опромінення часто викликає сильні побічні ефекти, особливо у дітей віком до 14 років, такі як нудота, зниження слуху, ушкодження шкіри, сліпота, хронічна сухість у роті внаслідок ушкодження слинних залоз, виразки шлунку або дванадцятипалої кишки, дисфункція щитовидної залози та ін. [Newhauser Front Oncol 2016]. У дітей, які проходили променеву терапію пухлин мозку, після одужання часто відзначаються нейрокогнітивні розлади [Stavinoha Bioengineering 2018].

Хіміотерапія передбачає використання препаратів, що ініціюють в ракових клітинах процеси апоптозу або некрозу. Більшість форм хіміотерапії діють на усі клітини, що швидко діляться, і не є специфічними саме до ракових клітин. Певна ступінь вибіркової дії хіміопрепаратів забезпечується лише за рахунок того, що ракові клітини, у порівнянні з нормальними, зазвичай мають нижчу здатність до репарації ДНК, а отже і до виживання після ушкодження генетичного матеріалу [Hurria J Clin Oncol 2016]. Вразливими до дії протипухлинних хіміопрепаратів є нормальні клітини організму, для яких характерна висока швидкість ділення: гемопоетичні клітини, імунокомпетентні клітини, клітини шкіри і придатків шкіри (волосся, нігті), клітини епітелію слизових оболонок шлунково-кишкового тракту, дихальних шляхів і сечовивідних шляхів. Це зумовлює принципову неможливість застосування високих доз хіміопрепаратів, що теоретично могли б повністю зруйнувати пухлинні утворення, та передбачає використання хіміотерапії лише як однієї із складових комплексного лікування [Wagner Cochrane Database of Syst Rev 2017]. Крім того, пухлинні клітини розташовані в гіпоксичних областях,

віддалених від судинної оболонки, майже не піддаються хіміотерапії [Muz *Huroxia* 2015].

Імунотерапія раку (іноді також називають імуноонкологією) – це штучне стимулювання імунної системи для посилення власної здатності організму боротися з хворобою, а також застосування препаратів клітин та макромолекул, що є складовими імунної системи, у якості лікарських засобів (ЛЗ) [Joseph *Science* 2004]. До основних імунотерапевтичних засобів належать імуномодельючі агенти (такі як цитокіни, інтерферони та інтерлейкіни), Т-клітинна трансферна терапія (розмножування власних Т-лімфоцитів людини у лабораторних умовах з наступним внутрішньовенним введенням) та інгібітори контрольних точок імунітету CTLA-4 та PD-L1 [Pardoll *Nat Rev Cancer* 2012]. Незважаючи на те, що імунотерапія використовує біологічні методи боротьби із захворюванням, таке лікування також не позбавлене побічних ефектів. Посилення імунних реакцій може знижувати їх специфічність і призводити тим самим до ураження не лише пухлинних, а й нормальних клітин організму. У різних випадках у пацієнтів розвиваються виразки на роті та шкірі, високий кров'яний тиск, застійна серцева недостатність, запальні захворювання легенів або синдром капілярного витоку, що призводить до поліорганної недостатності та шоку [Festino *Oncoimmunology* 2017].

Для деяких видів пухлин (наприклад, при раку молочної залози або передміхурової залози) може застосовуватися гормональна терапія [Stephen *J of the Nat Cancer Inst* 2015]. Основним принципом цього методу терапії є те, що пухлини таких форм раку є гормоночутливими, а отже блокування рецепторів відповідних гормонів (естрогену або тестостерону) шляхом прийому фармацевтичних препаратів-антагоністів призводить до затримки росту ракових клітин [Comstock *Oncogene* 2013]. Гормональна терапія може бути використана в якості додаткового методу лікування, що дозволяє стримувати ріст пухлинних клітин, однак для повноцінного

одужання пацієнтів від раку застосування самої лише гормонотерапії недостатньо [Ramos *Oncogene* 2015].

1.1.1 Системи адресної доставки лікарських засобів (ЛЗ) у терапії ракових пухлин

Як зазначено у попередньому розділі, традиційні методи лікування раку, характеризуються низьким рівнем виживання пацієнтів через вплив багатьох факторів, головний з яких – відсутність пухлинної специфічності, що призводить до небажаних побічних ефектів на здорові клітини та обмеження терапевтичної дози. Тому важливим є розвиток альтернативних методів терапії.

Основна мета цільової доставки лікарських засобів (ЛЗ) у лікуванні раку – зосередити терапію на пухлинах, не завдаючи шкоди здоровим клітинам. Коли починається метастазування, лікування слід проводити по всьому організму пацієнта, щоб знешкодити всі наявні пухлинні клітини, включаючи вторинні пухлинні утворення на ранніх стадіях розвитку. Однак таку задачу непросто вирішити, оскільки метаболічні шляхи та структури, на які діє більшість хіміопрепаратів у нормальній та пухлинній тканинах є ідентичними. У зв'язку з цим необхідно визначати «унікальні» ознаки пухлин, які відрізняють їх від нормальної оточуючої тканини [Chow *Science Transl Med* 2013].

Перші засоби спрямованої терапії раку з'явилися ще на початку 90-х років минулого сторіччя, і принцип їхньої дії базувався на характерному для пухлинних клітин ефекті посиленого проникнення та утримування (EPR-ефект от англ. enhanced permeability and retention effect), при якому структури певних розмірів мають тенденцію до більшого накопичення в тканинах пухлини, ніж в нормальних тканинах, унаслідок патологічних змін у стінках місцевих судин [Маклакова 2018]. У результаті було запропоновано використовувати у якості носіїв протипухлинних

препаратів різні типи нано- та мікроконтейнерів: нанотрубки, наногелі, ліпосоми, міцели, фулерени, дендримери та ін. (рис. 1.1). Проте більшість із таких систем досі не застосовуються у онкотерапії у зв'язку з низькою біосумісністю речовин, із яких вони синтезуються, та необхідністю додаткової модифікації поверхні [Filatova *Chem Rev* 2018]. Виключення складають ліпосоми, які синтезуються з природних фосфоліпідів і за хімічним складом подібні до клітинних мембран, а тому не потребують додаткової модифікації для набуття біосумісності, є нетоксичними, не викликають алергічних реакцій та піддаються біодерадації. На основі ліпосом було створено декілька успішних препаратів, таких як ліпосомальний доксорубіцин «Doxil» та ліпосомальний амфотерицин-В «Ambisome» [Li *Acta Pharm Sinica* 2019].

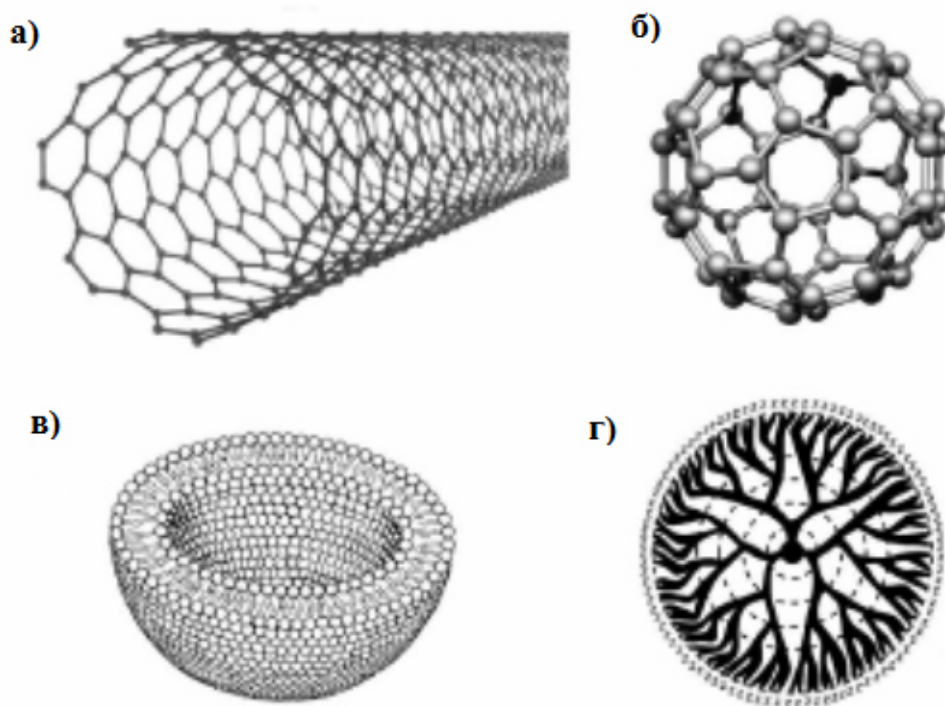


Рис. 1.1 – Структура носіїв ЛЗ, що застосовуються у онкотерапії: а – нанотрубка; б – фулерен; в – ліпосома; г – дендример [Постнов *Биотехносфера* 2013]

Оскільки дія препаратів спрямованої терапії першого покоління ґрунтується на пасивному транспорті за участі EPR-ефекту, їх використання не є ефективним для знешкодження новоутворених метастазів, а доцільне лише для лікування солідних пухлин [Zhao *J Nanomed Nanotechnol* 2018]. Тому у сучасних розробках систем адресної доставки ЛЗ зазвичай використовується специфічне розпізнавання рецепторів на поверхні ракових клітин, що дає змогу розпізнавати усі патологічні клітини незалежно від їх місцезнаходження. Для успішної реалізації даного підходу необхідно [Ivanenkov *Russ Chem Rev* 2017]: 1) знайти тип рецепторів, які у великих кількостях знаходяться на поверхні цільових клітин; 2) підібрати ліганд, який буде селективно взаємодіяти з рецептором-мішенню; 3) провести модифікацію ЛЗ векторною речовиною, зберігаючи при цьому біологічну активність засобу.

Рецептори, що використовуються для розпізнавання, не є унікальними і характерними лише для ракових клітин, однак відрізняються посиленням рівнем експресії, у порівнянні з нормальними клітинами [Cheng *Cell* 2004]. Наприклад, відомо, що клітини раку молочної залози, легень, головного мозку та деяких видів лімфом характеризуються більшою експресією рецепторів до трансферину (TfR), і на основі цього явища для терапії були розроблені кон'югати трансферину з рядом протипухлинних препаратів, що успішно інтерналізувалися в пухлинні клітини [Пятаев *Поволж. онк. весн.* 2012]. За аналогічним принципом було розроблено методи спрямованої доставки ЛЗ за участі рецептора фолієвої кислоти (FOLR) та асіалоглікопротеїнового рецептора (ASGP) [Sutradhar *Nanotechnology* 2014]. Найбільш вдалою розробкою з даної групи препаратів є «Вінтафолід», що проявив ефективність у монотерапії раку яєчників, шлунку та ендометрію матки до 57% [Vergote *Ther Adv Med Oncol* 2015].

У роботах [Sun *Bioconjugate Chemistry* 2008, Dharap *PNAS* 2005] на прикладі рецептора гонадотропін-вивільняючого гормону (LHRH) було

продемонстровано можливість замість природних лігандів використовувати аптамери – короткі одноланцюгові олігонуклеотиди, здатні з високою афінністю та специфічністю зв'язуватися з білковими молекулами.

Також у розробках систем адресної доставки широко використовують моноклональні антитіла до різних рецепторів на поверхні ракових клітин: TfrR [Filho BBA 2018], рецептора фактору росту епітелію EGFR, васкулярного ендотеліального фактор росту VEGF [Singh *Int J Nanomedicine* 2017], CD-рецепторів [Eisermann Cancers 2017, Shabo *Springer* 2011]. Застосування препаратів такого типу показує високу ефективність – терапевтична відповідь в 78% випадків та 45,5% стійкої ремісії [Никитин *Леч. врач* 2017]. Але введення в організм моноклональних антитіл до раково-специфічних антигенів підвищує ймовірність розвитку алергічних та аутоімунних реакцій, що стає перешкодою для їх широкого застосування [Anish *Oncology* 2016]. Крім того, суттєвою проблемою усіх методів онкотерапії, у тому числі методів адресної доставки, є недостатня ефективність дії щодо внутрішніх гіпоксичних та некротичних ділянок пухлин, які зазвичай виявляють значну резистентність [Liu *Theranostics* 2016]. Тож пошуки нових способів адресної доставки наразі все ще залишаються актуальними.

1.2 Бактеріальна колонізація пухлин

Дедалі частіше почала розглядатися можливість використання бактерій у адресній доставці хіміопрепаратів та створенні векторів для генної терапії. Перші бактерії, за якими було помічено вплив на ракові клітини, належать до роду *Clostridium*. Ще у 1813 р. спостерігалася регресія пухлин у пацієнтів, у яких розвинулася супутня «газова гангрена», спричинена *C. perfringens* [Minton *Nat Rev Microbiol* 2003]. Пізніше було продемонстровано пухлинно-специфічне накопичення після введення

багатьох інших бактеріальних видів, включаючи Біфідобактерії, Шигелли, Сальмонели, холерний вібріон, *Listeria monocytogenes* та ін [Baban *Bioeng Bug* 2010].

Бактеріальна колонізація пухлин спочатку приписувалася гіпоксичній природі великих пухлин (низький рівень O_2) [Wei *Cancer Letters* 2007]. Гіпоксія спричиняється швидким розростанням пухлинних клітин та недостатнім кровопостачанням і є добре встановленою ознакою. У роботі [Song *Infect Agent Cancer* 2016] запропоновано, що анаеробна природа гіпоксичних і некротичних областей у пухлинах сприяє зростанню анаеробних та факультативно-анаеробних бактерій.

Області некрозу можуть також забезпечувати поживні речовини, такі як пурини, для подальшого сприяння росту бактерій. Тому бактеріальний хемотаксис до хіміоатрактантних сполук, присутніх у некротичних областях (наприклад, аспартат, серин, цитрат, рибоза або галактоза), що виробляються раковими клітинами, також розглядається як фактор, що сприяє накопиченню бактерій у пухлинах [Cronin *Mol Ther* 2010].

Однак з новими дослідженнями [Thoma *Lancet Oncol* 2016, Tech *ScienceDaily* 2018] дедалі більше стає очевидним, що до цього механізму можуть бути залучені й інші елементи унікального мікросередовища пухлин. По мірі розвитку пухлин, вони сприяють утворенню нових кровоносних судин (неоангіогенез). Однак ці новоутворені судини сильно дезорганізовані з неповними ендотеліальними шарами (рис.1.2) та сліпими кінцями, що призводить до «протікання» судин та млявого кровотоку [Goldufsky *Current Understanding and Progress* 2015]. Така особливість будови може давати можливість циркулюючим бактеріям легко потрапляти з крові в пухлинні тканини та локалізуватися в них.

Ще одним фактором, що сприяє накопиченню бактерій в пухлинах може бути місцеве пригнічення імунітету [Baban *Bioeng Bug* 2010].

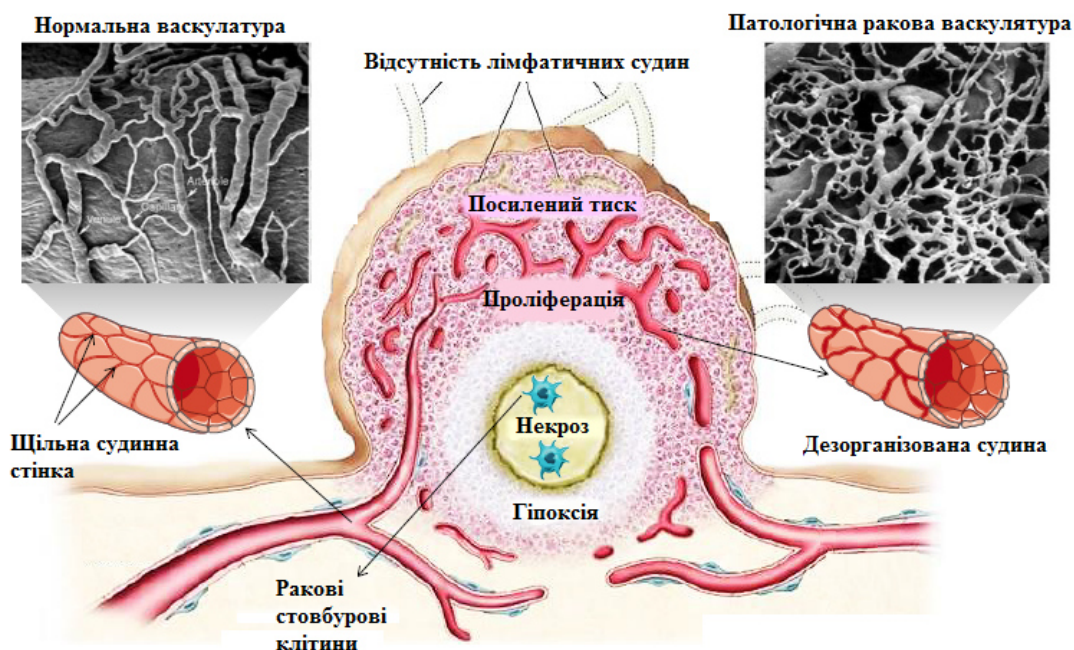


Рис. 1.2 – Схематичне зображення пухлинного неоангіогенезу та інших факторів, що сприяють бактеріальній колонізації пухлин [Taherkhani, 2015]

1.3 Біогенні магнітні наночастинки (БМН) у пухлинних клітинах

Як було показано у роботах [Brem et al. J. R. Soc. Interface 2006; Чехун *Наноструктурное материаловедение* 2011] окрім таких особливостей як наявність гіпоксичних ділянок, утворення неоваскулятури та пригнічення місцевого імунітету, пухлини характеризуються також здатністю до посиленого утворення біогенних магнітних наночастинок (рис.1.3). БМН є залізовмісними нанокристаллами антиферомагнетиків або феритів – магнетиту (Fe_3O_4), магеміту (Fe_2O_3), грейгіту (Fe_3S_4) та ін., що формуються в процесі біомінералізації, тобто контрольованого на генетичному рівні синтезу [Gorobets *Functional Mater* 2012]. Така ознака ракових клітин відрізняє їх від нормальної навколишньої тканини, а отже

також може слугувати фактором розпізнавання бактеріями при специфічному накопиченні.

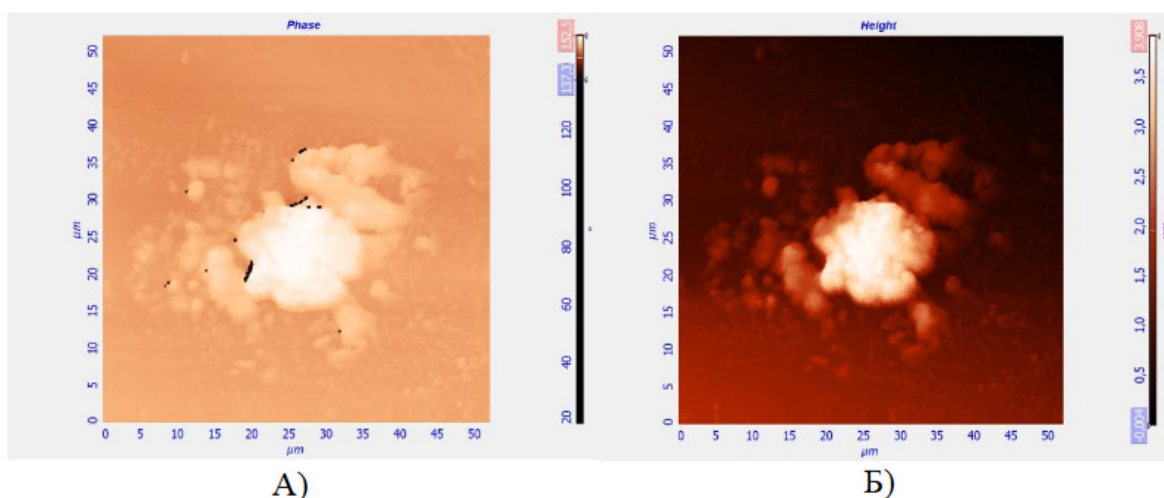


Рис. 1.3 - Ланцюжки БМН у клітинах карциноми Ерліха: а – МСМ, б - АСМ [Чехун *Наноструктурное материаловедение* 2011]

За розрахунками [Gorobets *Inn Biosyst and Bioeng* 2018] сила магнітодипольної взаємодії між БМН ракової та бактеріальної клітини, становить приблизно 10^{-7} - 10^{-8} Н і, маючи близький порядок величини із силами специфічного зв'язування антиген-антитіло, навіть дещо перевищує їх значення. Це означає, що у разі, якщо бактерії, для яких було показано здатність до пухлино-специфічного накопичення, є продуцентами БМН, то сили магнітодипольної взаємодії відіграють роль одного з факторів бактеріальної колонізації пухлин.

1.4 Механізм біомінералізації БМН

Біомінералізація – це генетично запрограмований процес синтезу клітинами широкого спектру мінеральних кристалів із заданими розмірами та структурою [Горобець 2018]. Особливий інтерес серед

внутрішньоклітинних мінеральних утворень становлять залізовмісні біогенні магнітні наночастинки, представлені нанокристалами феритів (магнетиту, маггеміту, грейгіту та ін.), завдяки своїм магнітним властивостям. Вперше вони були виявлені у магнітотаксисних бактерій у 1975 р. і з того часу знайдені у багатьох організмів, що належать до усіх трьох надцарств: Архей, Прокаріотів та Еукаріотів. При чому, як було виявлено у дослідженнях [Gorobets Dekker *ENN* 2014, Bharde *Langmuir* 2008], для усіх цих організмів характерний єдиний механізм біомінералізації БМН.

З огляду на відмінності у магнітних властивостях, розрізняють БМН двох типів: без залишкової намагніченості (антиферромагнітні БМН і феритові БМН в суперпарамагнітному стані) та із залишковою намагніченістю (феритові в однодоменному і багатодоменному станах). Як правило, феритові одно- та багатодоменні БМН мають постійну залишкову намагніченість, яку зберігають у широкому діапазоні зміни температур (табл. 3.1) і створюють поблизу себе, неоднорідне магнітне поле величиною, приблизно на 4 порядки більше магнітного поля Землі [Gorobets Dekker *E of Nanosci and Nanotech* 2014].

БМН у багатоклітинних організмів мають розміри до 1 мкм, а в одноклітинних значно менші – близько 10 нм (рис. 1.4) [Горобець 2018].

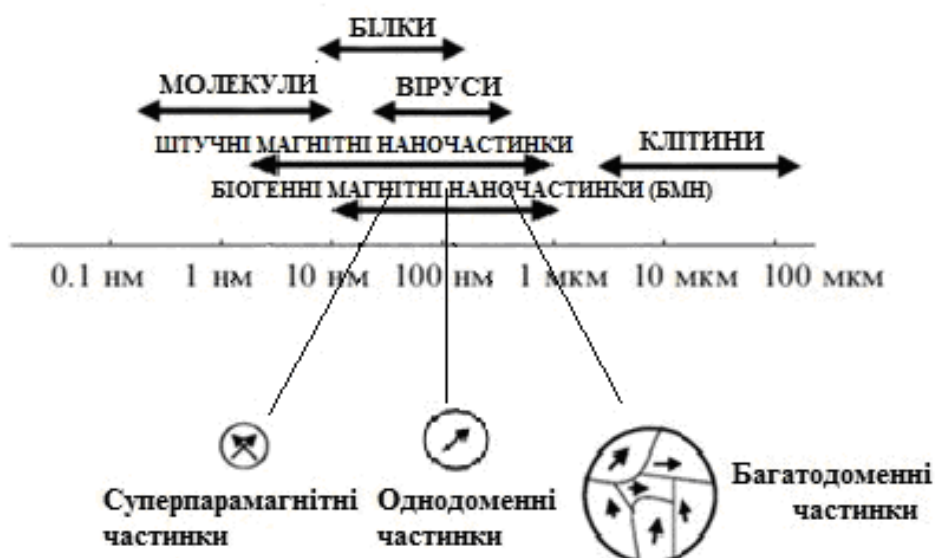


Рис. 1.4 - Розміри біогенних магнітних частинок різних типів у порівнянні з розмірами штучних магнітних наночастинок та деяких біооб'єктів [Горобець 2018]

Найбільш дослідженим явище біомінералізації є у магнітотаксисної бактерії (МТБ) *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, у якої цей процес контролюється Mam-білками, незамінними з яких для процесу біомінералізації БМН є білки MamB, MamM, MamA, MamE, MamO, MamK [Ullrich *J Bacteriol* 2005]. Тому амінокислотні послідовності цих білків використовуються для біоінформаційного пошуку організмів продуцентів БМН шляхом визначення гомології з їх протеомами. Наявність гомології з певними Mam-білками свідчить про здатність організмів синтезувати БМН відповідних типів (табл. 1.1).

Таблиця 1.1 - Класифікація БМН немагнітотаксисних мікроорганізмів відповідно до наявності у протеомі гомологів білків МО МТБ [Горобець 2018]

Гомологи білків МО МТБ у немагнітотаксисних організмів	Зовнішньо-клітинні аморфні БМН (1 група)	Зовнішньо-клітинні кристалічні БМН (2 група)	Внутрішньо-клітинні аморфні БМН (3 група)	Внутрішньо-клітинні кристалічні БМН (4 група)
<i>MamA</i>	—	+	—	+
<i>MamB</i>	+	+	+	+
<i>MamM</i>	+	+	+	+
<i>MamO</i>	—	—	+	+
<i>MamE</i>	—	—	+	+
<i>MamK</i>	—	—	+	+

Присутність гомологів білків *MamB* і *MamM* МТБ є необхідним для синтезу усіх типів БМН, оскільки ці білки відповідальні за транспорт катіонів металів та ініціацію процесу біомінералізації. Гомолог білка *MamA* відповідає за формування кристалічної структури БМН, і у разі його відсутності відбувається порушення просторової організації комплексів ключових білків біомінералізації в мембранах магнітосом, що призводить до накопичення аморфних БМН. Гомологи серинових протеаз *MamO* та *MamE*, що є трансмембранними білками, необхідні для утворення внутрішньо-клітинних БМН, оскільки забезпечують позиціонування іонних каналів, транспортерів та рецепторів до залізовмісних сполук у мембранах магнітосом у правильній просторовій орієнтації, необхідній для біомінералізації. Гомолог білка *MamK* відповідальний за формування зв'язаних із мембраною ланцюжків БМН [Wei National Science Review2019].

Загальна схема процесу біомінералізації внутрішньоклітинних БМН у немагнітотаксисних організмів за участі гомологів Mam-білків наведена на рис. 1.5.

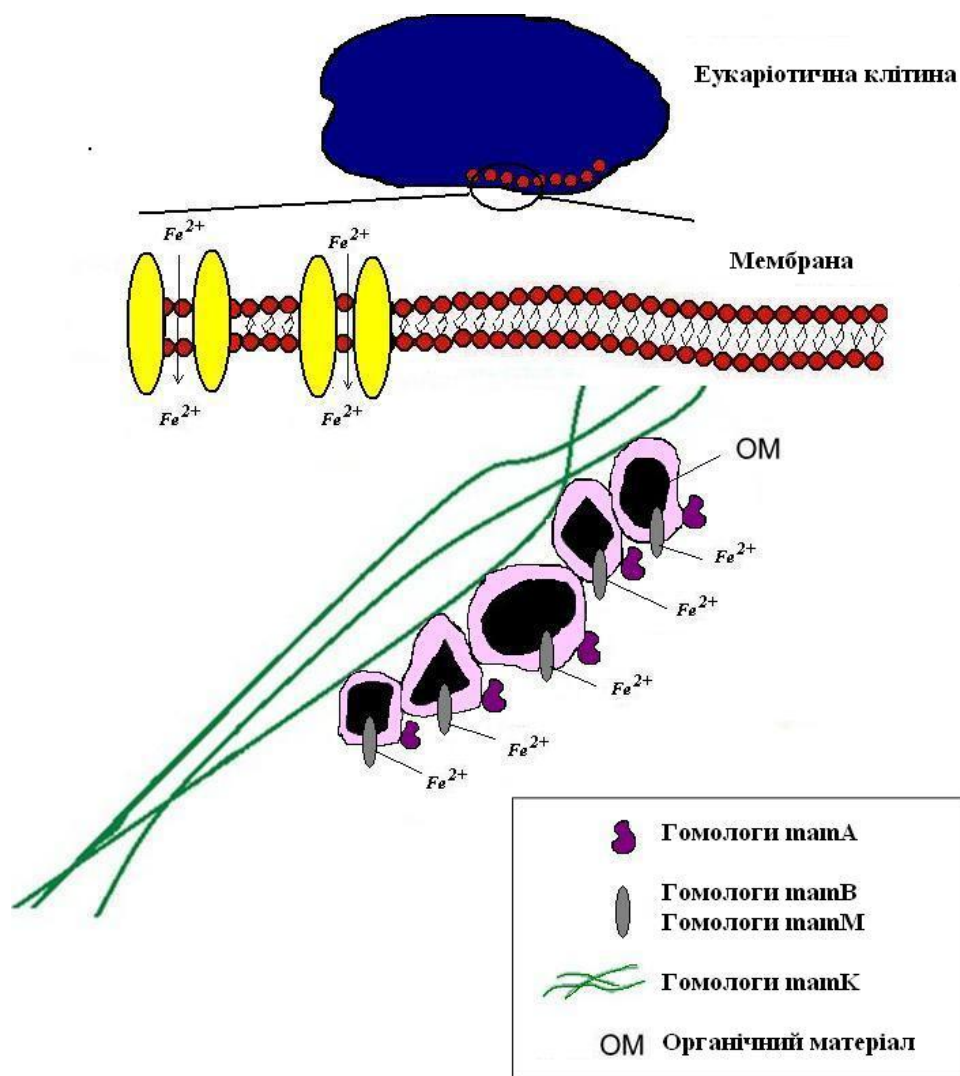


Рис. 1.5 - Схема процесу біомінералізації внутрішньоклітинних БМН у клітинах немагнітотаксисних бактерій, еукаріотів та архей [Горобець 2018].

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали досліджень

У якості матеріалів для проведення біоінформаційних досліджень виступали протеоми бактерій, здатних до накопичення в пухлинах, протеоми пробіотичних бактерій, та амінокислотні послідовності білків магнітосомного острівця бактерії *M. Gryphiswaldense MSR-1* узяті з бази NCBI.

Для дослідження зміни магнітних властивостей бактерій при їх вирощуванні на хелатному середовищі та у магнітному полі використовувалась культура *E.coli* Nissle 1917, стандартні середовища МПА (м'ясо-пептонний агар) та МПБ (м'ясо-пептонний бульон), водний розчин хелату заліза (32мг/мл). Хелатне середовище для культивування було зроблено шляхом додавання до МПА розчину хелату заліза у перерахунку 32мг хелату на 1 л середовища [Salmanpour *Sci Agri Bohemica* 2018].

Для виділення лецитину і синтезу ліпосом використовувався сухий яєчний жовток, 96% етиловий спирт, ацетон, сантимольярний (0,01М) розчин натрій-фосфатного буферу (pH=7,2-7,4) [Магдеева *Ученые записки* 2015]. Для синтезу діальдегіддекстрану застосовувався 5%-й колоїдний розчин декстрану з молекулярною масою 40 кДа та 30%-й розчин перекису водню [Шкурупий 2012].

2.2 Методи досліджень

2.2.1 Метод попарного вирівнювання амінокислотних послідовностей у програмі «BLAST»

Здатність бактерій до утворення БМН виявляли за допомогою проведення біоінформаційного аналізу їх протеомів з використанням методів порівняльної геноміки у програмі «BLAST» (Basic Local Alignment Search Tool) бази даних NCBI [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. Ця онлайн-програма проводить порівняння нуклеотидних чи амінокислотних послідовностей, наявних у базі даних, представлених на сайті NCBI, і потім обчислює відсоток співпадінь для кожної з пар послідовностей, які порівнюються [Johnson *Nucleic Acids Research* 2008].

Принцип використання програми «BLAST» у даному дослідженні базується на пошуку у протеомах досліджуваних мікроорганізмів гомологів Mam-білків, обов'язкових для біомінералізації БМН у магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1* (MamA, MamB, MamM, MamO, MamE) та білку MamK. Білки-гомологи мають спільне походження і подібну тривимірну структуру та можуть мати спільні активні ділянки зв'язування або домени, що у більшості випадків визначає виконання цими білками спільних функцій. Тому виявлення у протеомі організму гомологів певних Mam-білків з подібними функціями дозволяє прогнозувати у нього здатність до синтезу БМН [Gorobets *Functional Mater* 2012].

При визначенні подібності послідовностей ключовим елементом є матриця замін, оскільки вона визначає показники подібності для будь-якої можливої пари нуклеотидів або амінокислот. У дослідженні використовували матрицю амінокислотних замін BLOSUM62 (Blocks Substitution matrix 62% identity – блокова матриця замін, побудована на

наборі білків, що мають 62% і більше відсотків ідентичних амінокислотних залишків).

Для оцінки співпадінь амінокислотних послідовностей білків при вирівнюваннях враховувалися наступні значення:

1) E-число – показник статистичної значимості вирівнювання, що вказує на рівень прояву фактора випадковості при співпадинні позицій амінокислотних залишків порівнюваних білків. Нижче значення E-числа вказує на менший рівень вияву чинника випадковості при співпадинні амінокислотних залишків білків, які порівнюються. Загалом же величина цього показника має бути не більше 0,05 [Stover *Essential Lab Tech* 2017];

2) Ident (I) – відсоток ідентичних амінокислотних залишків при попарному вирівнюванні заданих послідовностей білків. Вважається, що коли:

а) два білки мають більш як 45%, то вони матимуть дуже схожі структури та, з великою імовірністю, однакові чи, принаймні, спільні функції;

б) понад 25% – імовірно, не мають аналогічної структури, проте механізми фолдингу є подібними, а тому можлива гомологія білків;

в) 18–25% визначають як «сумнівну зону» – допускається гомологія, але необхідне проведення додаткової перевірки;

3) Length – довжина вирівнювання (мусить бути не менше 100 амінокислотних залишків для того, щоб були застосовними критерії 1), 2а-2в) [Stover *Essential Lab Tech* 2017].

Окрім перевірки зазначених параметрів співпадінь послідовностей амінокислотних ланцюгів для визначення гомології порівнювалися також функції досліджуваних білків.

2.2.2 Атомно-силова та магнітно-силова мікроскопія

Експериментальне виявлення біогенних магнітних наночастинок в клітинах бактерій проводили за допомогою скануючого зондового мікроскопу Solver PRO-M. Робота такого мікроскопу ґрунтується на реєстрації силової взаємодії між поверхнею досліджуваного зразка із зондом (рис. 2.1).

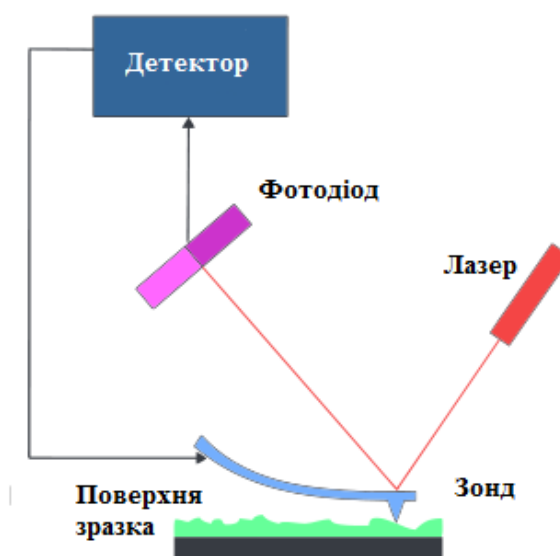


Рис. 2.1 – Схема роботи скануючого зондового мікроскопа [Sugimoto *Nature* 2007]

При цьому для МСМ силою взаємодії між намагніченим зондом (голкою) та зразком є магнітна сила, а сили Ван-дер-Ваальса, які змінюються в залежності від відстані між зондом та зразком, використовуються для отримання топографії поверхні (АСМ). Сили Ван-дер-Ваальса діють на короткій відстані між зондом і зразком, а магнітна сила – на більшій відстані. Тому задля порівняння результатів використовують методику подвійного сканування: при першому проходженні зонд сканує поверхню зразка в режимі атомно-силової

мікроскопії, а в другому дистанція «зонд-зразок» збільшується, і зміщений зонд проводить повторне сканування за тією ж траєкторією, отримуючи MCM-сигнал (рис. 2.2) [Gustavo Nano Biomed Eng 2014].

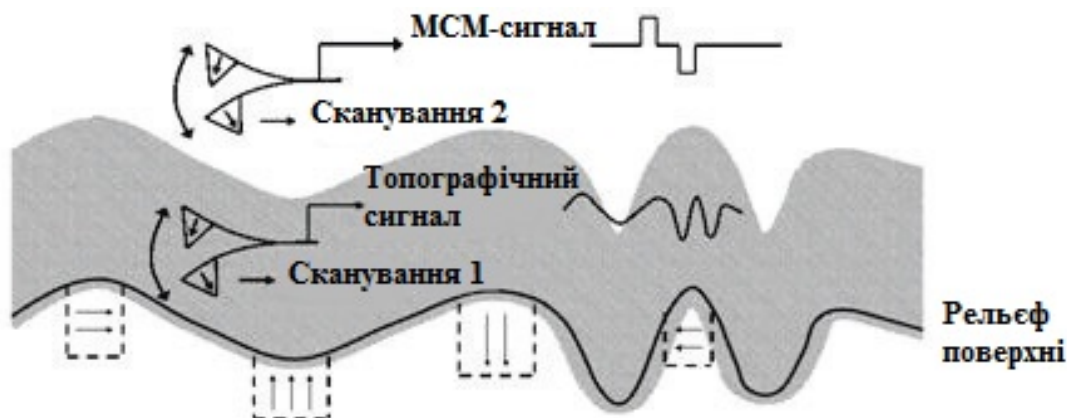


Рис. 2.2 – Схема сканування поверхні зразка зондовим мікроскопом для отримання знімків ACM та MCM [Degen *Applied Physics Letters* 2008]

2.2.3 Аналіз із застосуванням системи двох постійних магнітів

Для визначення магнітних властивостей бактерій, проводився аналіз з застосуванням системи двох постійних магнітів за наступною методикою. На покривне скло 0,2 мм завтовшки, розташоване над поверхнею контакту двох постійних магнітів з різним напрямком намагніченості, де створюється високоградієнтне магнітне поле (ВГМП), наносили бактеріальну суспензію, після чого залишали до повного висихання. Оскільки поблизу поверхні контакту магнітів створюється більша напруженість магнітного поля, ніж поблизу середини кожного з двох магнітів системи, то бактерії, що містять БМН, притягуються до неї, розташовуючись у вигляді смуги (рис. 2.3 а).

Товщину смуги з бактерій, що утворювалася над поверхнею контакту магнітів, оцінювали за допомогою мікролінійки (рис. 2.3 б) та програми Gwyddion.

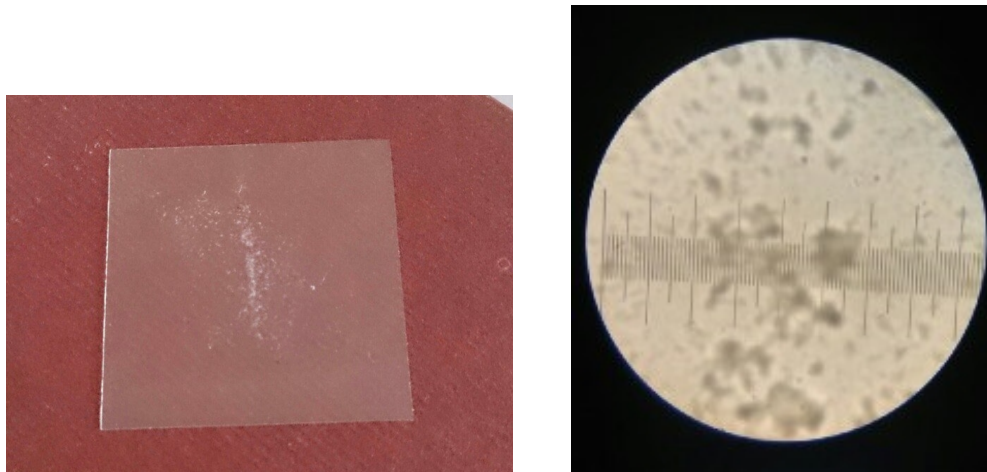


Рис. 2.3 – Аналіз на системі двох магнітів з поверхнею контакту магнітів: а – препарат *E.coli* Nissle 1917, висушений на поверхні контакту магнітів; б – утворення смуги з клітин бактерій на поверхні контакту магнітів.

2.2.4 Аналіз та візуалізація даних у програмі «Gwyddion»

«Gwyddion» – це модульна програма для візуалізації та аналізу результатів мікроскопії, розроблена Чеським інститутом метрології, головна задача якої – забезпечити швидкі та повторювані процедури статистичної обробки, вирівнювання та корекції даних [Necas *Open Physics* 2019]. У програмі представлені зручні інструменти маркування конкретних областей для проведення з ними подальших операцій, таких як визначення площі поверхні та розмірів окремих частинок (рис. 2.4). Використання цих інструментів при проведенні дослідження магнітних властивостей бактерій на системі двох магнітів з поверхнею контакту магнітів дозволило розрахувати значення ширини та площі поверхні смуг, утворених з бактеріальних клітин, статистичний розподіл діаметрів бактеріальних

кластерів та їх середні значення. Також програма «Gwyddion» застосовувалася для обчислення розмірів синтезованих ліпосом та бактеріально-ліпосомальних комплексів.

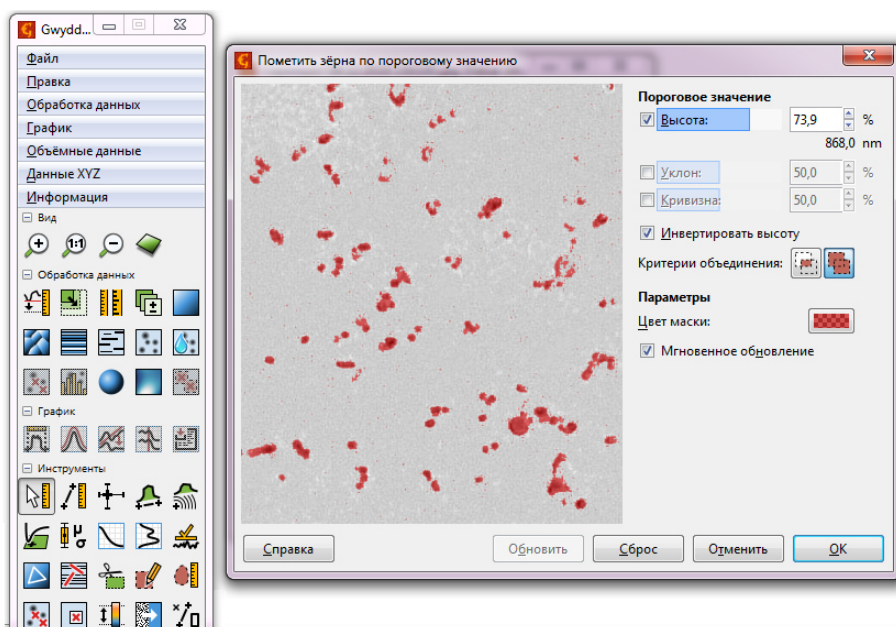


Рис. 2.4 – Інтерфейс програми «Gwyddion» (функція виділення об'єктів)

2.2.5 Синтез ліпосом

Для синтезу ліпосом використовувався яєчний лецитин, котрий було виділено наступним чином. До 1 г сухого яєчного жовтку додавали 6 мл етилового спирту. Потім рідину відфільтровували та додавали 0,4 мл ацетону. Помутніння розчину свідчило про осадження лецитину. Суміш центрифугували впродовж 3-4 хв при 2000 об./хв. Надосадову рідину зливали, а лецитин, що випав у осад, розчиняли у 10 мл етанолу та використовували для синтезу ліпосом [Магдеева *Ученые записки* 2015].

Ліпосоми отримували за допомогою методу дегідратації/регідратації (рис. 2.5) за наступною методикою. Отриманий 1%-й розчин лецитину у

етиловому спирті вносили в круглодонну колбу 100 см³ роторного випарювача та випарювали при температурі водяної бані 60°C до утворення ліпідної плівки на стінках колби. Маса отриманих фосfolіпідів складала 2,42 г. Далі у колбу додавали 15 мл сантимольного (0,01M) розчину натрій-фосфатного буферу (pH=7,2-7,4) та струшували впродовж 2 хв для утворення ліпосом [Шилова 2017].

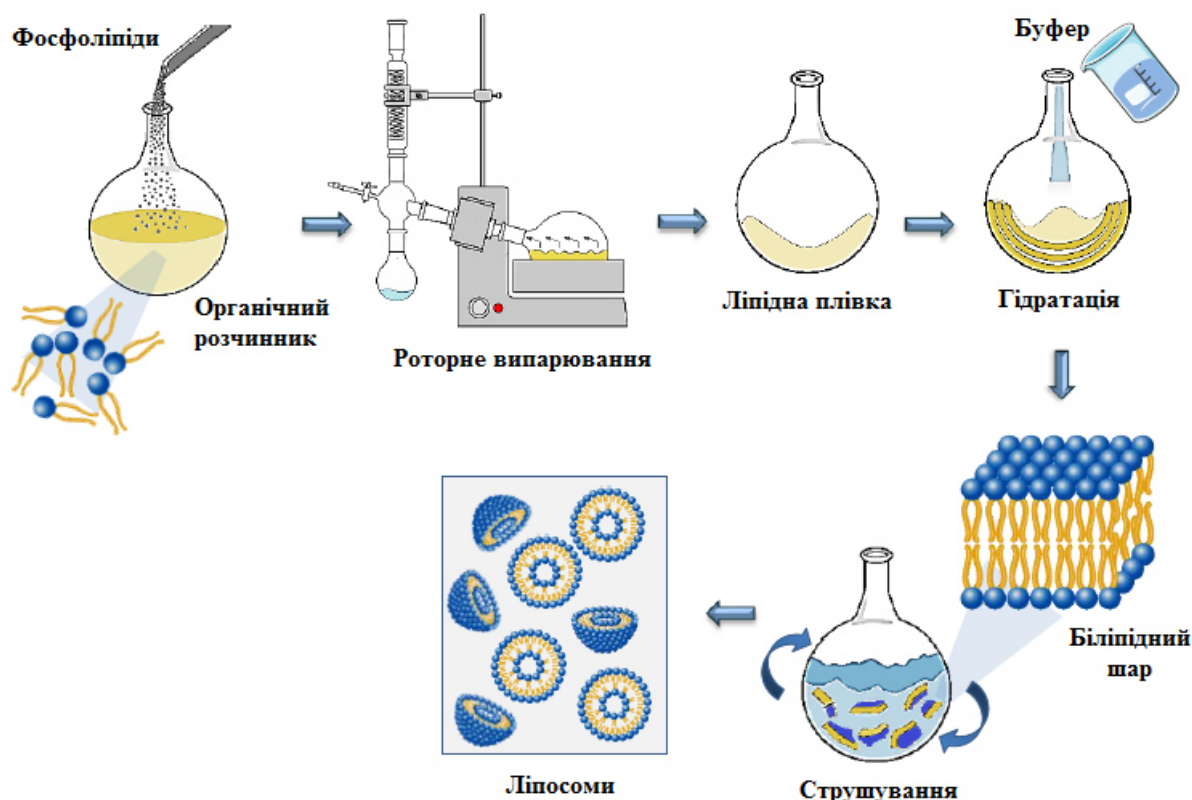


Рис. 2.5— Схема синтезу ліпосом за методом дегідратації/регидратації [Taherkhani 2015]

2.2.6 Прикріплення ліпосом до поверхні бактеріальних клітин

Для з'язування ліпосом з клітинами бактерії, поверхню ліпосом модифікували за допомогою утворення зовнішньої оболонки з діальдегіддекстрану, що являє собою активну альдегідну форму

полісахариду декстрану (рис. 2.6). Структура діальдегіддекстрану дозволяє йому утворювати полімерну сітку на поверхні ліпосоми, а наявність альдегідних груп надає можливість прикріплення до поверхневих білків цитоплазматичної мембрани (ЦПМ) бактерій шляхом утворення азометинового зв'язку з білковими аміногрупами.

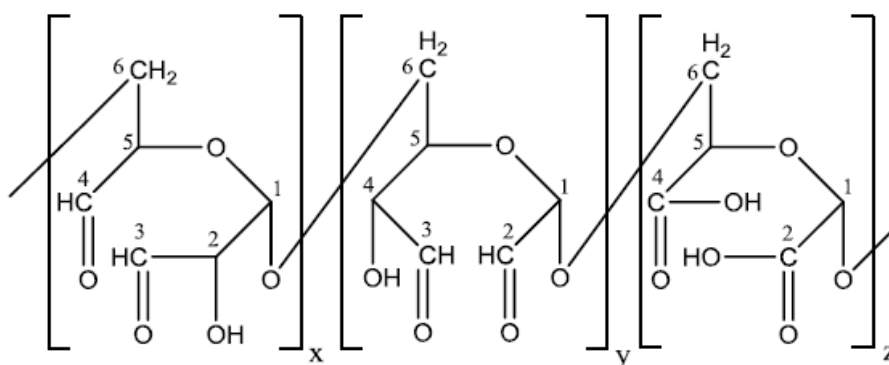


Рис. 2.6 – Полімерний ланцюг діальдегіддекстрану

Синтез діальдегіддекстрану шляхом перекисного окиснення декстрану проводився за методикою, описаною у [Шкурूपий 2012]. До 15 мл 5%-го водного розчину декстрану (40кДа) додавали 3 мл 30%-го розчину перекису водню. Отриману суміш перемішували та виливали у посуд з інертного матеріалу з плоским дном (скляні чашки Петрі) так, аби товщина шару рідини не перевищувала 3 мм. Окиснення проводили у сухожаровій шафі при 90°C впродовж 2 год.

Далі отриманий сухий порошок діальдегіддекстрану масою 1,6г розчиняли у 25 мл дистильованої води. Для утворення полімерної оболонки на поверхні ліпосоми 20 мл утвореного розчину додавали до 15 мл ліпосомальної суспензії та перемішували за допомогою лабораторної мішалки впродовж 1 год при кімнатній температурі. Після цього до суміші додавали ще 5 мл розчину діальдегіддекстрану та 12 мл бактеріальної суспензії з концентрацією $3 \cdot 10^7$ кл/мл і перемішували мішалкою впродовж

20 хв, внаслідок чого відбувалося зв'язування ліпосом з бактеріальними клітинами [Фролов *Вестник КузГТУ* 2012].

3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ





3.1 Виявлення продуцентів БМН серед бактерій, які характеризуються пухлино-специфічним накопиченням

Відомо [Чехун *Наноструктурное материаловедение* 2011], що пухлини характеризуються посиленням синтезом БМН та сила магнітодипольної взаємодії між БМН пухлинних клітин та БМН бактерій при певних умовах є достатньою для накопиченні бактерій з природними феримагнітними властивостями у пухлинах [Mikeshyna *Acta Physica Polonica* 2018], постає необхідність дослідження бактерій, для яких вже було експериментально показано пухлино-специфічне накопичення, на предмет здатності до утворення БМН. Це дуже важливе питання з точки зору можливості використання таких бактерій як векторів для адресної доставки ЛЗ з використанням магнітних технологій.

Для вирішення цього питання застосовувалися методи порівняльної геноміки, а саме: попарне та множинне вирівнювання у програмі «BLAST» Національного центру біотехнологічної інформації США. Проведено порівняння амінокислотних послідовностей Мат-білків, що є необхідними для процесу біомінералізації у магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 [Gorobets *Biol Systemy* 2013], з протеомами бактерій, для яких експериментально показано здатність до пухлино-специфічного накопичення:





- 1) *Clostridium perfringens* [Li *J of the Nat Cancer Inst* 2008],
- 2) *Clostridium butyricum* M-55 [Heppner *Acta Neurochir* 2007],
- 3) *Clostridium novyi*-NT [Bettegowda *Proc Natl Acad Sci USA* 2003],
- 4) *Bifidobacterium longum* WT [Cronin *Mol Ther* 2010],
- 5) *Bifidobacterium breve* UCC2003 [Cronin *Mol Ther* 2010],
- 6) *Salmonella enterica ser. typhimurium* VNP20009 [Friedlos *Clin Cancer Res* 2008],

- 7) *Escherichia coli* O1 [Buttaro *Current Gene Therapy* 2010],
- 8) *Vibrio cholerae* [Shabahang *Nat Biotechnol* 2004],
- 9) *Listeria monocytogenes* 10403S [Tangney *Bioengineered bugs* 2010, Flickinger *Vaccines* 2018],
- 10) *Shigella sonnei* WT [Galmbacher *PloS ONE* 2010],
- 11) *Shigella flexneri* [Galmbacher *PloS ONE* 2010],
- 12) *Pseudomonas aeruginosa* PA103 [Goldufsky *J of med microbiology* 2015],
- 13) *Staphylococcus aureus* WT [Cronin *Cancer Gene Ther* 2012],
- 14) *Salmonella enterica* ser. choleraesuis WT [Lee *Cancer Gene Therapy* 2005],
- 15) *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 [Castellarin *Genome Res* 2012].

Вирівнювання Mam-білків, необхідних для біомінералізації (MamA, MamB, MamM, MamO, MamE, MamK), магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 з протеомами бактерій, що здатні до накопичення у ракових пухлинах, наведені у табл. 3.1. Для позначення ступеню розшифрування геному в базі NCBI у табл.1 використано наступні позначення:  – геном організму розшифровано повністю;  – геном організму розшифровано на $\frac{3}{4}$;  – геном організму розшифровано на $\frac{1}{2}$;  – геном організму розшифровано на $\frac{1}{4}$.

Таблиця 3.1 - Вирівнювання між Мам-білками МТБ *M. gryphiswaldense MSR-1* та геномами бактерій з доведеним пухлино-специфічним накопиченням.

Штам мікроорганізмів	Ступінь розшифрування геному	Е-число (<i>I</i> ,%)					
		Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1</i>					
		MamA	MamB	MamM	MamO	MamE	MamK
<i>Clostridium perfringens</i>		8e-40 (21,09%)	2e-86 (20,22%)	5e-29 (28,25%)	9e-09 (24,39%)	4e-32 (40,87%)	6e-12 (28,49%)
<i>Clostridium butyricum</i> M-55		17 (29,27%)	6e-86 (19,73%)	7e-33 (31,33%)	9e-12 (27,94%)	1e-30 (43,02%)	2e-12 (27,30%)
<i>Clostridium novyi-NT</i>		2e-27 (20,71%)	4e-85 (20,07%)	9e-26 (30,68%)	1e-06 (27,19%)	1e-28 (37,98%)	5e-12 (27,87%)
<i>Bifidobacterium longum</i> WT (wild type)		8e-09 (35,56%)	5e-36 (20,31%)	3,1 (32,91%)	1e-07 (23,29%)	4e-24 (40,33%)	0.28 (26,56%)
<i>Bifidobacterium breve</i> UCC2003		6.4 (29,89%)	4e-16 (27,53%)	5e-04 (24,07%)	1e-06 (24,88%)	3e-25 (40,88%)	0.34 (38,46%)
<i>Salmonella enterica ser. typhimurium</i> VNP20009		0,029 (23,84%)	3e-109 (24,13%)	8e-12 (22,69%)	2e-70 (28,57%)	4e-119 (31,32%)	3e-95 (21,01%)
<i>Escherichia coli</i> O1		0,043 (24,50%)	6e-111 (24,83%)	2e-29 (31,89%)	7e-77 (28,64%)	5e-121 (32,74%)	2e-95 (21,30%)
<i>Vibrio cholerae</i>		2e-31 (22,38%)	1e-95 (23,55%)	2e-11 (22,88%)	8e-69 (28%)	3e-113 (35%)	7e-92 (19,53%)
<i>Listeria monocytogenes</i> 10403S		2e-38 (19,37%)	7e-89 (22,68%)	3e-31 (32,67%)	1e-64 (28,83%)	2e-25 (41,48%)	2e-117 (22,08%)
<i>Shigella sonnei</i> WT		3e-29 (17,44%)	1e-108 (24,48%)	3e-85 (20,08%)	8e-12 (28,90%)	1e-34 (40,19%)	2e-47 (23,30%)
<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301		6e-28	1e-110	2e-116	7e-12	4e-36	7e-108

		(20,71%)	(23,78%)	(22,96%)	(29,48%)	(39,90%)	(24,52%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA103		5e-12 (15,38%)	3e-89 (20,21%)	1e-80 (22,53%)	5e-91 (23,19%)	9e-34 (44,83%)	2e-118 (23,75%)
<i>Staphylococcus aureus</i> WT		1e-76 (21,33%)	4e-98 (23,10%)	2e-90 (26,90%)	6e-80 (23,44%)	7e-29 (45,14%)	1e-08 (21,11%)
<i>Salmonella enterica ser. choleraesuis</i> WT		7e-72 (23,84%)	8e-96 (27,91%)	6e-112 (22,69%)	2e-73 (25,90%)	2e-86 (19,23%)	3e-95 (19,23%)
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586		9e-52 (22,64%)	6e-85 (21,05%)	1e-82 (21,26%)	0.085 (25,55%)	0.36 (29,19%)	4e-12 (27,86%)

Отримані дані свідчать, що 14 з 15 досліджених мікроорганізмів є продуцентами БМН, оскільки це підтверджують відповідні значення показника статистичної значимості співпадінь (Е-число) та відсотку ідентичних амінокислотних залишків (I), а також спільні функції білків. При цьому згідно з класифікацією [Gorobets Functional Materials 2014]. *Clostridium perfringens*, *Clostridium novyi*-NT, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes* 10403S, *Shigella sonnei* WT, *Shigella flexneri* 2a str. 301, *Pseudomonas aeruginosa* PA103, *Staphylococcus aureus* WT, *Salmonella enterica ser. choleraesuis* WT є продуцентами внутрішньоклітинних кристалічних БМН, *Clostridium butyricum* M-55 синтезує внутрішньоклітинні аморфні БМН, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 – зовнішньоклітинні кристалічні БМН, а *Bifidobacterium breve* UCC2003 – зовнішньоклітинні аморфні. *Salmonella enterica ser. typhimurium* VNP20009 і *Escherichia coli* O1 є продуцентами внутрішньоклітинних БМН, проте визначення їх форми (кристалічна чи аморфна) потребує подальшого розшифрування геномів цих мікроорганізмів. У *Bifidobacterium longum* WT не було встановлено значимого результату вирівнювання з білком MamM через недостатній ступінь розшифрування геному у базі даних NCBI. Але,

оскільки цей білок є гомологічним до MamB, з яким у протеомі *B. longum* WT було виявлено співпадіння, то слід вважати, що даний мікроорганізм також є продуцентом кристалічних БМН.

Таким чином, результати проведеного біоінформаційного аналізу показують, що усі бактерії, для яких було експериментально показано здатність до специфічного накопичення у пухлинах, є продуцентами біогенних магнітних наночастинок.

3.2 Визначення критеріїв вибору бактеріального штаму для створення системи адресної доставки

Як було показано у попередньому розділі, одним з факторів успішного закріплення бактеріальних клітин у пухлинній тканині, може бути їх здатність до синтезу БМН. Крім того, наявність магнітних наночастинок в клітинах бактерій дозволяє застосувати зовнішні магнітні поля для їх транспорту та локалізації в місці розташування пухлини і тим самим підвищити біодоступність препарату.

Зважаючи на інформацію, наведену у розділі 1.2, важливим критерієм при виборі штаму для створення системи адресної доставки є його здатність до існування у аеробних умовах. Ця властивість дозволяє бактеріям глибоко проникати у гіпоксичні ділянки пухлини, що важко піддаються терапії іншими методами.

Як препарат, що транспортуватиметься в організмі за допомогою кровотоку, система адресної доставки ЛЗ має легко орієнтуватися в найвужчих кровоносних судинах, а також мати здатність проникати з капілярів глибоко в тканини. Відомо, що діаметр найтонших капілярів складає 4 мкм, а розмір пор у їхніх стінках коливається від 0,38 до 2,5 мкм [Haiyun *Adv funct materials* 2010]. Отже розмір бактеріальної системи цільової доставки мусить не перевищувати 2,5 мкм.

Для виробництва біотехнологічного препарату важливо щоб штам, який використовується, було достатньо легко культивувати у промислових умовах, що дозволяє значно здешевити собівартість та зменшити трудоемність процесу виготовлення. Окрім цього перевага за можливості надається у першу чергу непатогенним формам для безпеки виробничого персоналу і споживачів.

Враховуючи, усі наведені фактори, слід вважати, що оптимальним для створення системи адресної доставки буде штам, що відповідає наступним вимогам:

- 1) Здатність до анаеробного дихання.
- 2) Здатність до синтезу БМН у кількості достатній для утримання БМН на пухлині.
- 3) Розмір менше 2,5 мкм.
- 4) Невибагливість до умов вирощування.
- 5) Безпечність для людей (непатогенність та нетоксикогенність).

3.3 Біоінформаційний пошук продуцентів БМН серед пробіотичних бактерій та вибір штаму для створення системи адресної доставки

Зважаючи на вимоги, що стосуються непатогенності та відносної простоти культивування, доцільно застосовувати пробіотичні штами бактерій, які зазвичай використовуються у терапевтичних цілях для нормалізації складу мікрофлори людини та як компоненти харчових продуктів і біологічно активних добавок. До цієї групи відносяться бактерії родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, деякі представники роду *Bacteroides*, *Streptococcus thermophilus*, непатогенні штами кишкової палички *Escherichia coli* та ін.

Для визначення продуцентів БМН серед пробіотичних бактерій було виконано біоінформаційний аналіз з використанням методів порівняльної геноміки у програмі BLAST Національного центру біотехнологічної інформації США (NCBI). Проводилися вирівнювання протеомів пробіотичних бактерій з амінокислотними послідовностями обов'язкових для біомінералізації Mam-білків магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. У табл. 3.2. наведені найбільш значимі результати вирівнювань, які вказують на здатність до утворення БМН у зазначених штамів.

Таблиця 3.2 - Вирівнювання між білками Mam-групи бактерії *M. gryphiswaldense* MSR-1 та протеомами пробіотичних бактерій

Штам мікроорганізму	E-число (I, %)					
	Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1					
	MamA	MamB	MamM	MamO	MamE	MamK
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	0.001 (23,86%)	5e-37 (30,54%)	2e-29 (29,89%)	3e-09 (29,70%)	1e-35 (40,38%)	4e-16 (33,33%)
<i>Lactobacillus plantarum</i> P-8	0.25 (18,71%)	7e-07 (25,32%)	5e-08 (21,17%)	3e-05 (26,74%)	2e-26 (40,91%)	0.019 (22,26%)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 30SC	0,002 (23,52%)	2e-11 (24,11%)	4e-12 (24,51%)	3e-06 (25,21%)	3e-23 (38,83%)	1e-13 (27,92%)
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> JCM 7041	2e-08 (31,67%)	1e-05 (19,37%)	8e-05 (26,05%)	5e-25 (30,91%)	1e-05 (38,12%)	1e-09 (31,09%)
<i>Bacteroides pectinophilus</i> ATCC 43243	1e-07 (27,74%)	2e-39 (29,45%)	7e-33 (31,39%)	6e-14 (24,74%)	2e-30 (46,33%)	2e-07 (25,63%)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	4,0 (29,25%)	2e-05 (36,17%)	6e-08 (23,43%)	4e-24 (32,86%)	2e-07 (41,36%)	2e-09 (26,58%)
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> DSM 20271	0.086 (39,62%)	5e-17 (27,19%)	6e-21 (25,49%)	1e-06 (25,37%)	6e-18 (37,16%)	0,003 (27,48%)

З усіх штамів продуцентів БМН, наведених у табл. 3.2 вимогам щодо розміру менше 2 мкм та здатності до анаеробного дихання відповідають

Escherichia coli Nissle 1917 та *Propionibacterium freudenreichii* DSM 20271. Отже ці мікроорганізми можуть бути використані у подальших дослідженнях щодо розробки системи адресної доставки ЛЗ для терапії раку. Для застосування у даній роботі було обрано штам *Escherichia coli* Nissle 1917, що представлений на українському фармацевтичному ринку у формі монокультурного пробіотичного засобу «Мутафлор».

3.4 Експериментальне визначення наявності БМН у клітинах *Escherichia coli* Nissle 1917

Накопичення БМН у *E.coli* Nissle 1917 оцінювалося за допомогою методів атомно-силової та магнітно-силової мікроскопії (рис. 3.1).

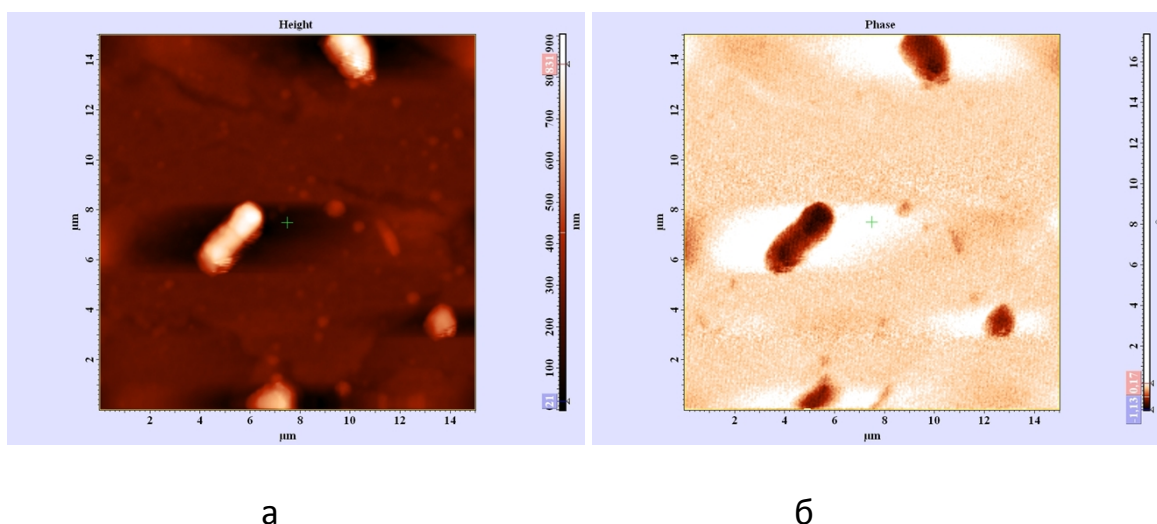


Рис. 3.1 - Знімки клітин *E.coli* Nissle 1917, отримані методами АСМ (а) і МСМ (б)

На зображенні МСМ спостерігався нерівномірний розподіл магнітної фази всередині контуру клітини у вигляді скупчень різного розміру, подібно до результатів з роботи [Vainshtein *Biology of the Cell* 2002], де проводилося дослідження БМН у *Escherichia coli* VKM В-126 за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії (рис. 3.2).

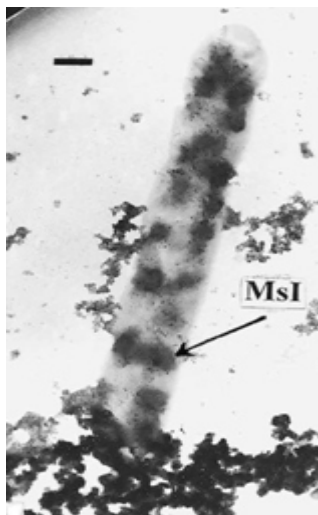


Рис. 3.2 – Електронна мікрофотографія БМН у клітині *Escherichia coli* VKM B-126. Bar – 0.5 мкм [Vainshtein *Biology of the Cell* 2002]

Такий результат, згідно з [Vainshtein *Biology of the Cell* 2002] та [Gorobets *Functional Mater* 2014] свідчить про те що БМН, наявні у клітинах *E.coli* Nissle 1917 є аморфними.

3.5 Дослідження впливу середовища з хелатом заліза та зовнішнього магнітного поля на посилення магнітних властивостей *E.coli* Nissle 1917 як бактерії-продуцента БМН

Для інтенсифікації процесу утворення БМН та посилення магнітних властивостей клітин *E.coli* Nissle 1917 було запропоновано використовувати середовище з додаванням хелату заліза (32 мг/л) та вирощування клітин *E.coli* Nissle 1917 під впливом зовнішнього постійного магнітного поля (H_0) з індукцією 0,15 Тл. Проводилося дослідження впливу зазначених факторів на бактеріальну культуру і аналіз зміни магнітних властивостей клітин.

Культуру *E.coli* Nissle 1917 вирощували на хелатному середовищі впродовж двох днів у оптимальних температурних умовах – 37°C. Після

цього за допомогою методів ACM і MCM повторно оцінювалися морфологічні характеристики БМН бактерій (рис. 3.3).

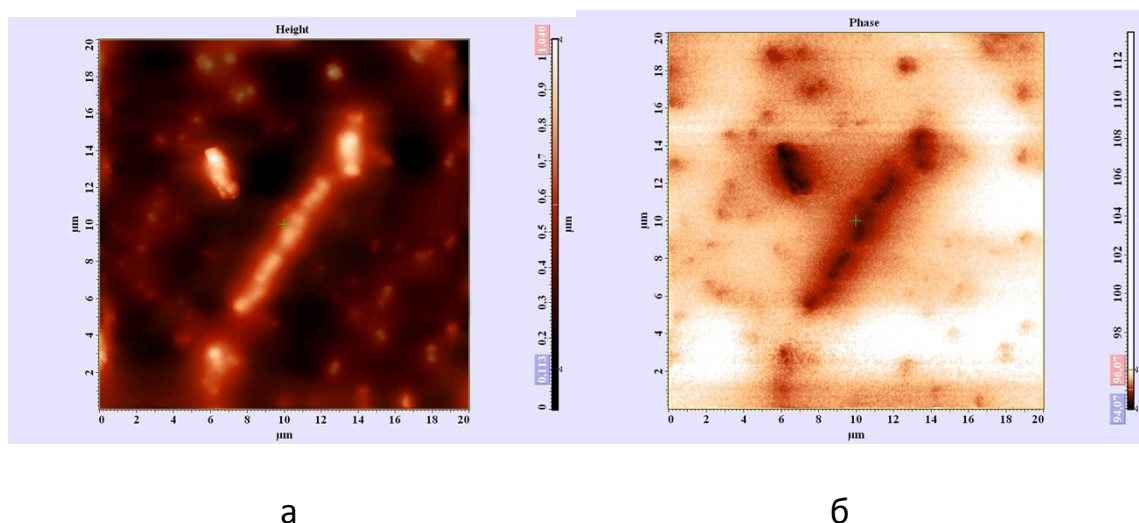
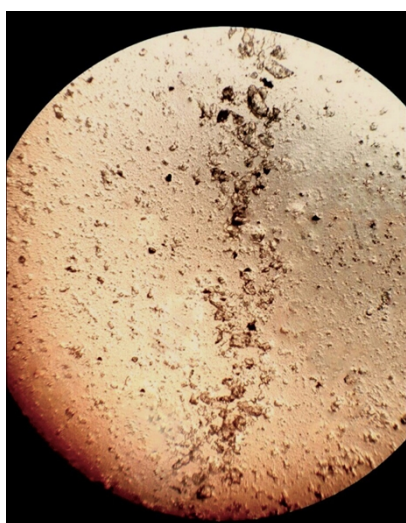


Рис. 3.3 - ACM (а) і MCM (б) зображення клітин *E.coli* Nissle 1917, вирощених на середовищі із хелатом заліза.

Як видно з рис. 3.3, після вирощування на хелатному середовищі досягається накопичення більшої кількості БМН: на MCM-знімку магнітна фаза займає практично весь внутрішній об'єм клітини та виявляє значно більшу силу манітної взаємодії зі скануючим зондом.

Для порівняння магнітних властивостей бактерій, вирощених: а) на стандартному, б) на хелатному середовищах, в) на стандартному середовищі під впливом зовнішнього магнітного поля, та г) на хелатному середовищі під впливом зовнішнього магнітного поля, зразки суспензій чотирьох досліджуваних культур аналізували з застосуванням системи двох постійних магнітів на поверхні контакту магнітів. Для цього 0,02 мл кожної суспензії з концентрацією $3 \cdot 10^7$ кл/мл наносили на покривне скло (товщина 0,2 мм), що було розміщене над поверхнею контакту системи двох постійних магнітів. Ширина смуги (рис. 3.4), що утворилася над поверхнею контакту системи двох постійних магнітів характеризує силу

магнітної взаємодії БМН бактерій з ВГМП, створеним поверхнею контакту системи двох постійних магнітів.



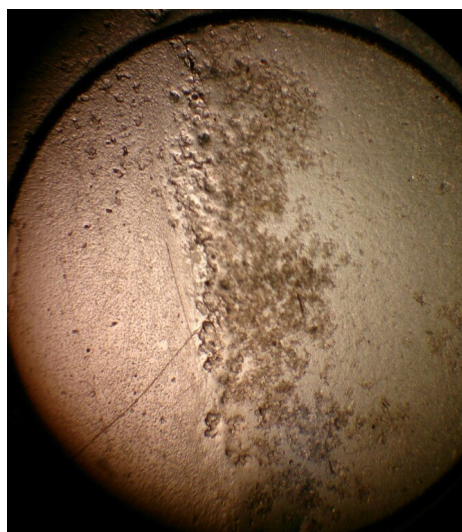
а)



б)



в)



г)

Рис. 3.4 – Результати дослідження осадження клітин бактерій *E.coli* Nissle 1917 з БМН над поверхнею контакту системи двох постійних магнітів: а) – клітини бактерій, вирощені на стандартному середовищі (контроль), б) – вирощені на середовищі з додаванням хелатів, в) – вирощені на стандартному середовищі під впливом зовнішнього

магнітного поля, г) – вирощені на середовищі з додаванням хелатів під впливом зовнішнього магнітного поля.

Обробка результатів проводилася у програмі Gwyddion, за допомогою якої було визначено ширину та площу поверхні смуг, утворених з бактеріальних клітин, і середні діаметри кластерів бактеріальних клітин. Результати обчислень наведені у табл. 3.3.

Таблиця 3.3 – Результати обчислень у програмі Gwyddion

Зразки вирощені	Ширина смуги, мм	Площа поверхні смуги, мм ²	Середній діаметр кластерів, мкм
а) на стандартному середовищі (контроль)	0,5	0,616	52,82
б) на середовищі з додаванням хелатів заліза	1,2	1,643	66,14
в) на стандартному середовищі під впливом зовнішнього МП	0,7	0,846	58,74
г) на середовищі з додаванням хелатів під впливом зовнішнього МП	1,75	1,740	65,74

Наведені у табл. 3.3 дані показують, що кількість бактерій, які накопичувались на поверхні контакту системи двох постійних магнітів у зразків, вирощених на середовищі з додаванням хелатів заліза була більшою у 2,67 рази в порівнянні з контролем; у вирощених на стандартному середовищі під впливом зовнішнього постійного магнітного

поля – у 1,37 рази більшою; а у тих, що росли на середовищі з додаванням хелатів під впливом зовнішнього МП в 2,83 рази.

Також за допомогою програми Gwyddion було побудовано графіки розподілу значень діаметрів між бактеріальними кластерами (рис.3.5). Інтерполяція даних графіка проводилася у системі комп'ютерної алгебри Mathcad.

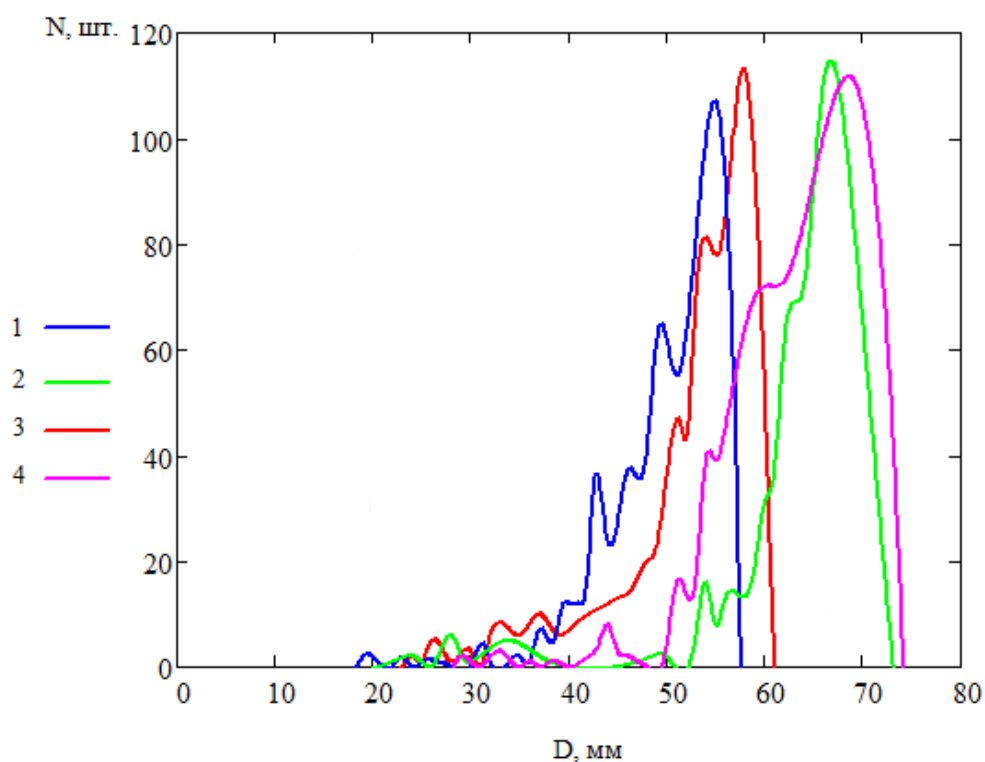


Рис. 3.5 – Графіки розподілу діаметрів кластерів бактеріальних клітин: N – кількість кластерів бактеріальних клітин, D – діаметр кластерів бактеріальних клітин; 1 – клітини бактерій *E.coli* Nissle 1917, вирощені на стандартному середовищі (контроль), 2 – вирощені на середовищі з додаванням хелатів, 3 – вирощені на стандартному середовищі під впливом зовнішнього постійного магнітного поля, 4 – вирощені на середовищі з додаванням хелатів під впливом зовнішнього постійного магнітного поля.

Графіки, наведені на рис. 3.5 вказують на те, що характер розподілу діаметрів бактеріальних кластерів чотирьох досліджуваних зразків є подібним для усіх чотирьох зразків, однак для зразків, вирощених під впливом зовнішнього постійного магнітного поля, середні та максимальні значення діаметрів кластерів є більшими.

Порівняння магнітофоретичної рухливості дослідних зразків проводилося шляхом вимірювання середньої швидкості руху бактерій, нанесених на покривне скло до поверхні контакту системи двох постійних магнітів.

Таблиця 3.4 – Середня швидкість руху клітин *E.coli* Nissle 1917 до поверхні контакту системи двох постійних магнітів.

Зразок	Середня швидкість руху клітин, мм/с
а) на стандартному середовищі (контроль)	0,7
б) на середовищі з додаванням хелатів заліза	1,6
в) на стандартному середовищі під впливом зовнішнього МП	1
г) на середовищі з додаванням хелатів під впливом зовнішнього МП	1,9

Таким чином, середня швидкість руху клітин, вирощених на хелатному середовищі у магнітному полі була вища у 2,7 рази в порівнянні з контролем, що узгоджується із результатами дослідження на поверхні контакту системи двох постійних магнітів.

На основі отриманих значень середніх швидкостей руху клітин в магнітному полі, розраховували співвідношення значень магнітофоретичної рухливості клітин *E.coli* Nissle 1917, вирощених в

різних спеціальних умовах до магнітофоретичної рухливості клітин *E.coli* Nissle 1917, вирощених у стандартних умовах за формулою:

$$\frac{\chi^{(1)}}{\chi^{(2)}} = \frac{V_x^{(1)} \left[r_{кл}^{(2)} \right]}{V_x^{(2)} \left[r_{кл}^{(1)} \right]},$$

де $\chi^{(1)}$ – магнітофоретична рухливість клітин *E.coli* Nissle 1917, вирощених в спеціальних умовах;

$\chi^{(2)}$ – магнітофоретична рухливість клітин *E.coli* Nissle 1917, вирощених у стандартних умовах (контроль);

$V_x^{(1)}$ – середня швидкість руху кластерів клітин *E.coli* Nissle 1917, вирощених в спеціальних умовах;

$V_x^{(2)}$ – середня швидкість руху кластерів клітин *E.coli* Nissle 1917, вирощених у стандартних умовах;

$r_{кл}^{(1)}$ – середній радіус кластерів клітин *E.coli* Nissle 1917, вирощених у спеціальних умовах;

$r_{кл}^{(2)}$ – середній радіус кластерів клітин *E.coli* Nissle 1917, вирощених у стандартних умовах.

Для кластерів бактеріальних клітин, вирощених на середовищі з додаванням хелатів заліза магнітофоретична рухливість відносно контролю становила:

$$\frac{\chi^{(2)}}{\chi^{(1)}} = \frac{1.6 \cdot (52,82)^2}{0.616 \cdot (66,14)^2} = 1,65,$$

для кластерів бактеріальних клітин, вирощених на стандартному середовищі під впливом зовнішнього МП:

$$\frac{\chi^{(4)}}{\chi^{(1)}} = \frac{1.74 \cdot (52,82)^2}{0.616 \cdot (65,74)^2} = 1,82,$$

а для кластерів бактеріальних клітин, вирощених на середовищі з додаванням хелатів під впливом зовнішнього МП:

$$\frac{\chi^{(3)}}{\chi^{(1)}} = \frac{0.846 \cdot (52,82)^2}{0.616 \cdot (58,74)^2} = 1,11$$

Узагальнення результатів розрахунку співвідношень магнітофоретичної рухливості наведено у табл. 3.5.

Таблиця 3.5 – Результати розрахунку співвідношень магнітофоретичної рухливості клітин *E.coli* Nissle 1917 вирощених в різних умовах до магнітофоретичної рухливості клітин *E.coli* Nissle 1917 вирощених у стандартних умовах

Умови вирощування	Магнітофоретична рухливість відносно контролю
б) на середовищі з додаванням хелатів заліза	1,65
в) на стандартному середовищі під впливом зовнішнього МП	1,11
г) на середовищі з додаванням хелатів під впливом зовнішнього МП	1,82

Таким чином, магнітофоретична рухливість, яка характеризує магнітні властивості бактеріальних кластерів культури клітин *E.coli* Nissle 1917, що росли на хелатному середовищі в умовах магнітного поля, збільшувалася у 1,82 рази у порівнянні з контролем. Отже застосування таких умов культивування дозволяє вирощувати бактерії *E.coli* Nissle 1917 з сильнішими магнітними властивостями, що збільшить їх ефективність використання у системі адресної доставки ЛЗ.

3.6 Дослідження впливу середовища з хелатом заліза та зовнішнього магнітного поля на інтенсивність росту *E.coli* Nissle 1917 як бактерії-продуцента БМН

Для створення технології синтезу системи адресної доставки, як і для будь-якої біотехнології, важливим є розуміння інтенсивності росту бактерій у заданих умовах. Щоб прослідкувати вплив хелатного середовища та магнітного поля на ріст *E.coli* Nissle 1917, проводили культивування впродовж 28 год з періодичним фіксуванням кількості живих клітин за допомогою підрахунку у камері Горяєва (табл. 3.6).

Таблиця 3.6 – Результати підрахунку клітин у камері Горяєва впродовж культивування *E.coli* Nissle 1917 в різних умовах

Умови культивування		Час культивування					
		0	4	10	16	22	28
Кількість клітин	а) на стандартному середовищі (контроль)	$1 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$	$3,7 \cdot 10^7$	$1,06 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$1,19 \cdot 10^8$
	в) на стандартному середовищі під впливом зовнішнього МП	$1 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^8$	$1,41 \cdot 10^8$	$1,39 \cdot 10^8$
	б) на середовищі з додаванням хелатів заліза	$1 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^7$	$3,9 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^8$	$1,18 \cdot 10^8$	$1,22 \cdot 10^8$
	г) на середовищі з додаванням хелатів під впливом зовнішнього МП	$1 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^7$	$1,22 \cdot 10^8$	$1,44 \cdot 10^8$	$1,42 \cdot 10^8$

За результатами підрахунку було побудовано графіки (рис. 3.6), які показують, що інтенсивність росту культури клітин *E.coli* Nissle 1917 змінюється тільки під впливом зовнішнього постійного магнітного поля і є вищою на 14%, ніж вирощених на стандартному середовищі та на середовищі з додаванням хелату заліза.

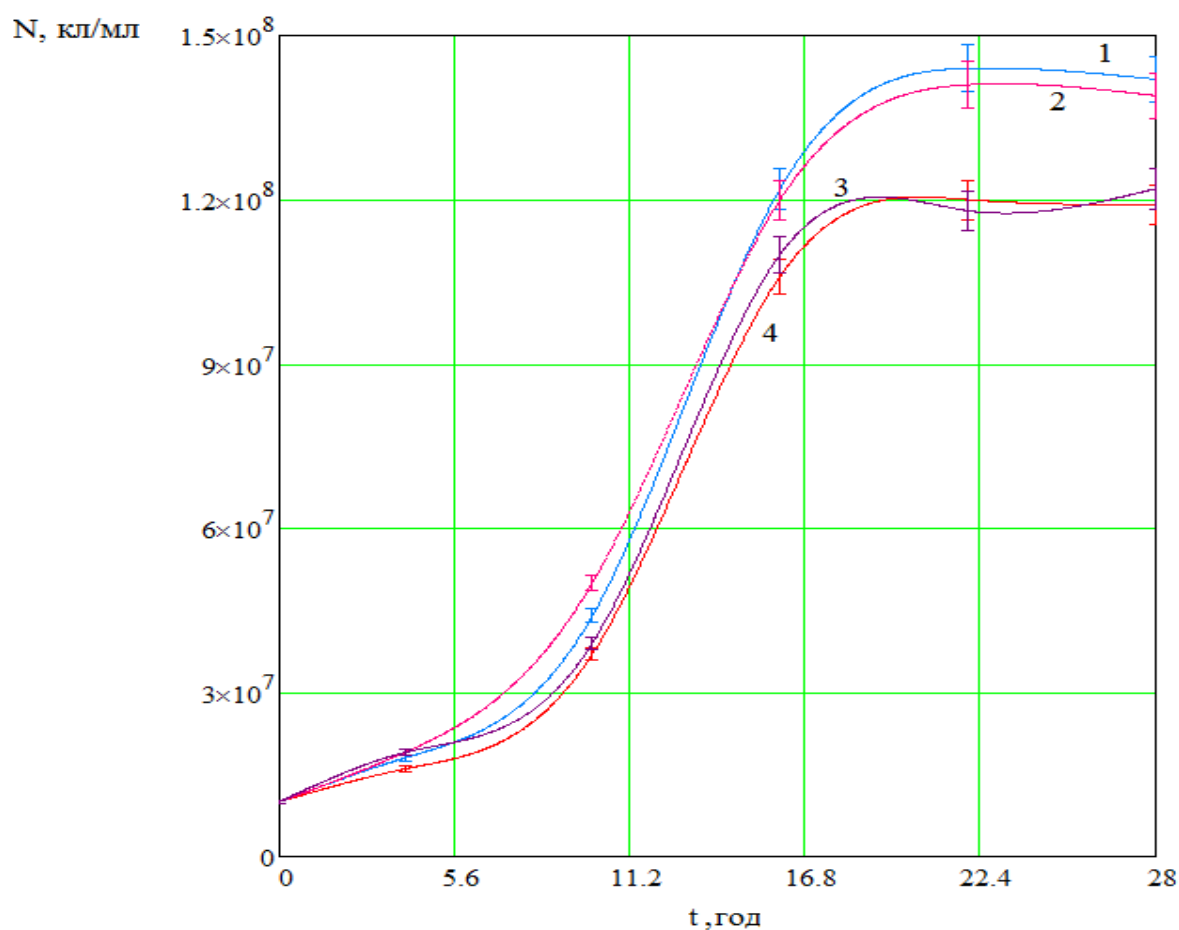


Рис. 3.6 – Графіки кривих росту *E.coli* Nissle 1917, що вирощувалися при різних умовах культивування: N – кількість кластерів клітин, t – час культивування; 1 – культури, вирощені на середовищі з додаванням хелатів під впливом зовнішнього МП; 2 – на стандартному середовищі під впливом зовнішнього МП; 3 – на середовищі з додаванням хелатів заліза; 4 – на стандартному середовищі (контроль).

3.7 Використання ліпосом у якості мікроконтейнерів для ЛЗ у системі адресної доставки на основі бактерії *E.coli* Nissle 1917

Зважаючи на доведені магнітні властивості, штам *E.coli* Nissle 1917 може бути використаний у створенні системи адресної доставки ліків, що скеровуватиметься за участі зовнішнього магнітного поля та локалізуватися на клітинах пухлин за рахунок сил магнітодипольній взаємодії БМН *E.coli* Nissle 1917 з БМН пухлинних клітин.

Для іммобілізації молекул лікарського засобу на поверхні бактеріальних клітин необхідно використовувати нано- або мікроконтейнери. Найбільш доцільно з цією метою застосовувати ліпосоми – мікроскопічні сферичні везикули, зазвичай розміром менше 1,5 мкм, що складаються з одного або декількох ліпідних шарів [Medvedeva *Biomed Khim* 2006]. На відміну від інших видів нано- та мікроконтейнерів (фулерени, міцели, ліпосоми, вуглецеві нанотрубки та ін.) ліпосоми синтезуються з природних фосфоліпідів і за хімічним складом подібні до клітинних мембран, а тому не потребують додаткової модифікації для набуття біосумісності, є нетоксичними, не викликають алергічних реакцій та піддаються біодеградації. Крім того ліпосоми є практично універсальними мікроконтейнерами, оскільки можуть переносити широкий спектр різних класів медичних хіміопрепаратів. Вивільнення ЛЗ у такій системі адресної доставки відбувається за рахунок виділення клітинами пухлини ферментів ліпаз та речовин-окисників, що руйнуватимуть ліпосоми [Rahman *Int. J. Nanomedicine* 2007]. Такий механізм здатен забезпечити поступове виділення ЛЗ, подовжуючи тим самим його дію.

Ліпосоми синтезували з яєчного лецитину за методикою дегідратації/регідратації, описаною у п.2.2.5. Результати утворення ліпосом перевіряли за допомогою світлової мікроскопії (рис. 3.8).

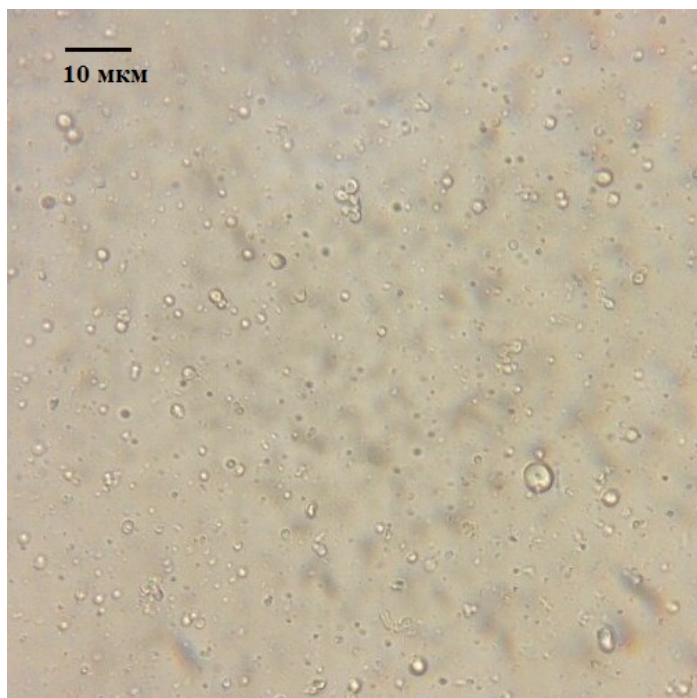


Рис. 3.8 – Мікрофотографія ліпосом

Розміри отриманих ліпосом вимірювали за допомогою аналізу мікрофотографії у програмі Gwyddion. Середнє значення діаметрів ліпосом становило 894,7 нм. Графік розподілу розмірів ліпосом наведено на рис. 3.9.

Як видно з графіку (рис. 3.9), розміри отриманих ліпосом не були цілком однорідними та подекуди перевищували 1 мкм (максимально допустимий розмір для використання при створенні системи адресної доставки ЛЗ). Це обумовлює необхідність додаткового використання при виробництві екструдерів (приладів, що формують ліпосоми однакового розміру шляхом продавлювання суспензії через отвори мембрани).

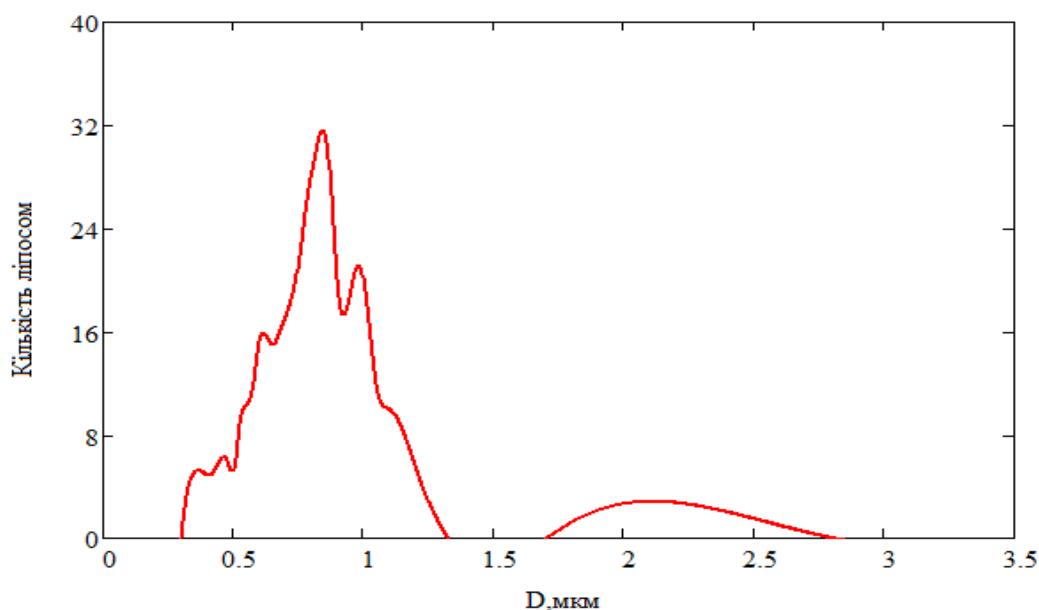


Рис. 3.9 - Графік розподілу діаметрів синтезованих ліпосом

Для іммобілізації ліпосом на бактеріальних клітинах проводили модифікацію поверхні ліпосом діальдегіддекстраном за методикою, описаною у п. 2.2.6. Вибір даного методу для створення системи адресної доставки обґрунтовано, по-перше, простотою його виконання, а, по-друге, тим, що діальдегіддекстран, на відміну від інших полімерів, які застосовуються для модифікації поверхні ліпосом, підлягає повній біодеградації в організмі людини [Фролов *Вестник КузГТУ* 2012].

Утворення ліпосомально-бактеріальних комплексів оцінювали за допомогою світлової мікроскопії, зразки суспензії фіксували на предметному склі та фарбували за допомогою фуксину. При цьому бактеріальні клітини набували темного забарвлення, а ліпосоми – більш світлого рожевого кольору. Мікрофотографія (рис.3.9) показує, що ліпосоми зв'язалися з бактеріальними клітинами, утворюючи комплекси.

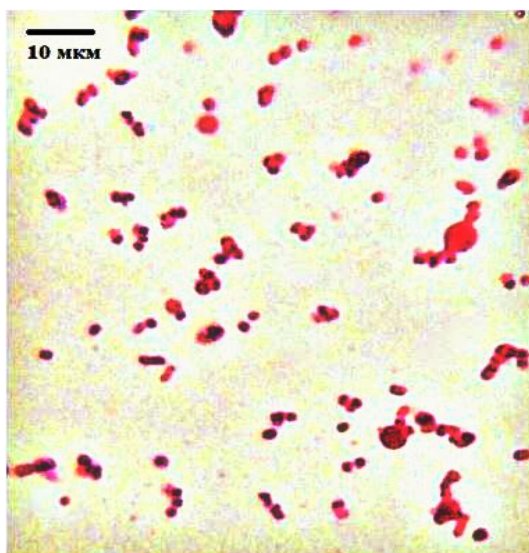


Рис. 3.9 – Мікрофотографія бактеріально-ліпосомальних комплексів

Таким чином, було отримано систему адресної доставки ЛЗ на основі пробіотичного штаму продуцента БМН *E.coli* Nissle 1917 та лецитинових ліпосом, яка, зважаючи на магнітні властивості бактерії, буде ефективно доставлятися у пухлини завдяки силі магнітодипольної взаємодії між БМН та зовнішнього керування цими комплексами за допомогою магнітного поля.

4 РОЗРОБКА СТАРТАП ПРОЕКТУ

4.1 Резюме

Бізнес ідея: створення магніточутливої системи адресної доставки лікарських засобів на основі бактерій *Escherichia coli* Nissle 1917 для терапії раку.

Мета наукової розробки: створення нового засобу спрямованої хіміотерапії раку задля зниження проявів побічних ефектів та підвищення ефективності лікування.

Назва розробки: «Система адресної доставки лікарських засобів на основі бактерій *Escherichia coli* Nissle 1917 для терапії раку»

Суб'єкт замовлення: НТУУ «КПІ ім. І. Сікорського».

Об'єкт дослідження: бактерії *E. coli* Nissle 1917.

Місце розробки в інноваційному ланцюжку цінності: дана ідея знаходиться на етапі розробки: завершено лабораторні дослідження, синтезовано систему адресної доставки та розроблено технологію виробництва лікарського препарату.

Продукт наукової розробки: нова система адресної доставки ЛЗ для цілеспрямованої хіміотерапії раку.

Технологія: посилення магнітних властивостей *E.coli* Nissle 1917 шляхом вирощування на середовищі з додаванням хелату заліза в магнітному полі та подальше прикріплення до поверхні клітин ліпосомальних мікроконтейнерів з протипухлинним хіміопрепаратом.

Доступність сировинної бази: бактеріальний штам *E.coli* Nissle 1917 виділено з доступного на українському ринку пробіотика «Мутафлор», реагенти закуплені в Україні через компанії поставників.

Кваліфікація персоналу:

1. Провідний спеціаліст – повна вища освіта за напрямком підготовки «Біотехнологія»; досвід роботи у мікробіологічній лабораторії – 3 роки.

2. Науковий керівник – повна вища освіта; досвід роботи з мікроорганізмами, наявність публікацій та статей у наукових журналах присвячених дослідженню магнітних властивостей бактерій, що синтезують біогенні магнітні наночастинки та розробці функціональних біотехнологічних продуктів з їх використанням.

Ринок збуту: онкологічні клініки та аптеки.

Модель підприємництва: B2B2C.

Резюме стартап-проекту наведене у табл. 4.1.

Таблиця 4.1 – Резюме стартап-проекту

Показник	Характеристика
1. Сутність ідеї	Створення магніточутливої системи адресної доставки лікарських засобів на основі бактерій <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 для терапії раку
2. Наявність аналогів або прототипів ідеї	Прототип – розробка СДЛЗ на основі бактерій <i>Magnetococcus marinus</i> MC-1 Політехнічного університету Монреалю (на етапі доклінічних досліджень)
3. Основна потреба, яку задовольнить реалізований стартап	Ефективне лікування онкологічних захворювань з низьким проявом побічних ефектів.

Продовження таблиці 4.1

4. Ступінь розробленості технології реалізації	Завершено лабораторні дослідження, синтезовано систему адресної доставки та розроблено технологію виробництва лікарського препарату
5. Класифікація продукту стартапу за міжнародною класифікацією товарів	050328 «ліки для людей»
6. КВЕД, до якого може належати дане виробництво	21.20 «Виробництво фармацевтичних препаратів і матеріалів» 46.46 «Оптова торгівля фармацевтичними товарами»
7. Очікувана потужність стартапу	Середнє
8. За масштабом виробництва	Масове
9. За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільне
10. За ресурсами, що споживатимуться	Матеріаломістке, працемістке, капіталомістке
11. За чисельністю персоналу	Середнє
12. Органи управління при реалізації стартапу	Національні

Продовження таблиці 4.1

13. Бажане географічне розташування: 1) потужностей стартапу; 2) офісу стартапу; 3) збутової мережі; 4) постачальників сировини та комплектуючих.	1) Київська область 2) м. Київ 3) Областні центри України 4) Україна, Німеччина
14. Місце ідеї у ланцюжку цінностей інноваційного процесу	На етапі розробки
15. Гранична корисність ідеї стартапу	Значне зменшення проявів побічних ефектів хіміотерапії при лікуванні онкологічних захворювань.
16. Бізнес-модель стартапу	B2B2C
17. Конкуренти вітчизняні (ціна, на якому етапі	Немає
18. Конкуренти іноземні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	Найближчий конкурент «Janssen Pharmaceutica» - виробник препарату ліпосомального доксорубіцину «Doxil»
19. Ключові фактори успіху стартапу	Якість, ефективність, безпечність
20. Планова кількість продукту розробки для першого етапу реалізації	590 500 од. за рік

Продовження таблиці 4.1

21. Споживачі на етапі розвитку	Українські онкологічні клініки та аптеки
22. Споживачі на етапі зрілості	Міжнародні онкологічні клініки та мережі аптек
23. Конкурентна ціна на продукт стартапу	32 525 грн
24. Капіталовкладення в бізнес-процеси	18 712 700 грн
25. Джерела фінансування	Власні та запозичені
26. Потенційні постачальники складових компонентів розробки (виділити вітчизняних і закордонних, плановий обсяг замовлень, наявна потужність постачальника)	Виробник бактеріального штаму <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917: «Ardeypharm», Німеччина. Виробники обладнання для цехів: «ОМЗ Мілеста-Україна»; «Solaris Biotech Solutions», Італія. Постачальник обладнання для лабораторій: «BioLabTech», Україна. Виробники сировинних матеріалів: «Хімтест Україна»; «Одеська біотехнологія».
27. Планове місце реалізації результату розробки	Будівництво виробничого комплексу у м. Васильків Київської області.

Продовження таблиці 4.1

28. Методи просування результатів розробки на ринок	Реклама в спеціалізованих ЗМІ, інформування провізорів аптек та лікарів через медичних представників та на освітньо-наукових заходах, розміщення детальної інформації на сайті компанії-виробника
---	---

4.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартап-проекту. Ключові фактори успіху

Середовище діяльності будь-якого підприємства можна охарактеризувати за допомогою наступної схеми, зображеної на рис. 4.2.



Рис. 4.1 – Зовнішнє, зовнішнє оперативне та внутрішнє середовище підприємства [Підлісна 2019]

У табл. 4.2 представлені потенційні загрози та можливості зовнішнього середовища підприємства із виробництва препаратів цілеспрямованої хіміотерапії раку.

Таблиця 4.2 – Загрози та можливості зовнішнього середовища підприємства

Загрози	Можливості
Політика	
1. Відсутність державної підтримки розвитку наукових досліджень; 2. Напруження політичних відносини з сусідніми країнами; 3. Зміни в законодавстві щодо вимог до фармацевтичних препаратів.	1. Пошук закордонних інвесторів; 2. Уніфікована система валідації з країнами ЄС; 3. Співпраця із закордонними клініками та аптечними мережами.
Економіка	
1. Нестабільність курсу валют; 2. Здорожчання обладнання та оборотних засобів; 3. Економічний стан середньостатистичного українського жителя не дозволяє купувати високовартісні препарати.	1. Стабільний розвиток фармацевтичної галузі; 2. Можливість наймати достатню кількість кваліфікованих кадрів; 3. Можливість взяти довгостроковий кредит; 4. Відсутність конкурентів на українському ринку.
Географія	
1. Відсутність в Україні виробників бактеріальних культур необхідного штаму.	1. Доступність імпортованих препаратів бактеріальних культур від європейських виробників. 2. Наявність в Україні виробників необхідної сировини та обладнання. 3. Зручність транспорту продукції до країн Європи та Близького Сходу.

Продовження таблиці 4.1

Демографія	
1. Трудова міграція населення за кордон.	1. Висока конкуренція серед працівників, що дозволяє обрати найкращих кандидатів.
2. Зменшення кількості випуску фахівців даної галузі учбовими закладами.	
Культура	
1. Недовіра до ефективності фармацевтичних препаратів вітчизняного виробництва.	1. Посилення інтересу інвесторів до біотехнології, внаслідок підвищення інформованості про можливості та перспективи даної галузі.
Науково – технічний прогрес	
1. Швидший темп науково-технічного прогресу в країнах Європи та Північної Америки.	1. Оптимізація технології виробництва.
2. Можлива поява конкурентів, що вироблятимуть аналогічні препарати.	2. Залучення нових висококваліфікованих спеціалістів.

Загрози та можливості зовнішнього середовища підприємства наведені у табл. 4.3.

Таблиця 4.3 – Оцінка переваг та недоліків зовнішнього оперативного середовища

Переваги	Недоліки
Постачальники	
1. Наявність в Україні виробників необхідної сировини та обладнання.	1. Відсутність в Україні виробників бактеріальних культур необхідного штаму.
Конкурент	
1. Відсутність аналогів на українському та світовому ринку. 2. Основний конкурент «Janssen Pharmaceutica» - виробляє препарат ліпосомального доксорубіцину «Doxil», що після появи на ринку препаратів СДЛЗ, стане застарілим методом лікування.	1. Конкурент довго працює на фармацевтичному ринку і добре зарекомендував себе, що на початку гальмуватиме перехід споживачів до препаратів нового покоління.
Споживачі	
1. Препарат вирішує особливо актуальну для споживачів проблему - зменшення проявів побічних ефектів хіміотерапії при лікуванні онкологічних захворювань.	1. Недовіра до ефективності фармацевтичних препаратів вітчизняного виробництва.

За результатами аналізу факторів зовнішнього і зовнішнього оперативного середовищ було проведено аналіз зацікавлених сторін для визначення потенційних загроз у процесі впровадження розробки (табл. 4.4).

Таблиця 4.4 – Аналіз зацікавлених сторін

Зацікавлена сторона	Вплив її на реалізацію проекту	Цікавість її до проекту	Загальний коефіцієнт впливу на проект
Зовнішнє оперативне середовище			
Конкурент	Може впливати шляхом негативної реклами у ЗМІ, зниження вартості на власну продукцію.	Зацікавлений у низьких продажах продукції.	0,1
Постачальник	Підвищення або зниження цін на сировину та обладнання, що встановлює постачальник чинитиме вплив на собівартість виробництва продукції.	Зацікавлений у розвитку виробництва та підвищенні його купівельної спроможності.	0,2

Продовження таблиці 4.4

Споживачі	Попит на продукцію ґрунтується на купівельній спроможності споживачів та їх задоволенням якістю продукції.	Зацікавлені у високій якості продукції та низькій ціні.	0,1
Зовнішнє середовище			
Політичні структури	Нестабільність внутрішньої та зовнішньої політичної ситуації може призвести до погіршення економічної обстановки в країні, що чинитиме свій вплив на розвиток підприємства.	Зацікавлені у функціонуванні великих підприємств в Україні як у факторі стабільного розвитку держави.	0,1

Продовження таблиці 4.4

Суб'єкти економічного середовища	Економічні показники, такі як курс валют, умови кредитування, інтенсивність інвестування коштів, купівельна спроможність споживачів та ін. впливають на стабільність та ефективність продажів.	Зацікавлені у розвитку українського виробника протиракових препаратів, що надасть додаткове надходження коштів у держбюджет.	0,2
Суб'єкти географії	Доступність сировини та обладнання й зручність транспортування продукції до мереж збуту сприятиме невисокій собівартості виробництва.	Не зацікавленими.	0,05

Продовження таблиці 4.4

Суб'єкти демографії	Зменшення кількості населення унаслідок трудової міграції та зниження народжуваності можуть призводити до нестачі спеціалістів на робочих місцях.	Зацікавлені у підвищенні ефективності лікування, що призведе до подовження тривалості життя громадян.	0,1
Суб'єкти культурного середовища	Поширення певної інформації у ЗМІ може чинити як позитивний, так і негативний вплив на продажі продукції.	Зацікавлені у покращенні якості життя людей та подовженні його тривалості.	0,05

Продовження таблиці 4.4

Суб'єкти НТП	Підвищення якості освіти та розробка нових технологій сприятиме оптимізації та розвитку виробництва.	Зацікавлені у розвитку виробництва, як місці для працевлаштуванн я спеціалістів та впровадження нових наукових розробок.	0,1
-----------------	---	--	-----

Також здійснено аналіз внутрішнього середовища майбутнього підприємства з метою визначення сильних та слабких сторін в процесі реалізації стартап-проекту: що саме буде сприяти впровадженню розробки, а що створюватиме перешкоди (табл. 4.5).

Таблиця 4.5 – Переваги і недоліки внутрішнього середовища

Складові внутрішнього середовища	Переваги	Недоліки
Реклама	Універсальна схема рекламування фармацевтичного препарату: реклама в спеціалізованих ЗМІ, інформування провізорів аптек та лікарів через медичних представників, розміщення детальної інформації на сайті компанії-виробника.	Високі витрати на забезпечення конкурентоздатності у порівнянні із великими фармацевтичними компаніями.

Продовження таблиці 4.5

Фінанси	Достатні фінансові ресурси, що забезпечуються кредитом у банку.	Обмежений потік зовнішніх інвестицій.
Виробництво	Сучасне обладнання забезпечуватиме високу якість та потужність виробництва.	Необхідність облаштування виробництва «з нуля» у зв'язку з відсутністю в Україні промислових об'єктів, на яких було б можливим впровадження інноваційної ідеї.
Персонал	Високий рівень підготовки спеціалістів у сфері фармацевтичного виробництва.	Недостатній досвід персоналу у роботі з бактеріями-продуцентами БМН.
Організація управління	Залучення до роботи підприємства спеціалістів з бізнес планування та реклами.	Невелика чисельність адміністративного персоналу на початкових етапах.

2.3. Визначення ключових факторів успіху проекту

На підставі аналізу факторів внутрішнього і зовнішнього оперативного середовищ було визначено ключові фактори успіху надання послуг за методом Шонфільда (табл. 4.6). Під ключовими

факторами успіху розглядалися параметри, на які компанія може самостійно впливати.

Оскільки представлена наукова розробка є інноваційною та не має аналогів на ринку, у якості конкурента розглядається виробник найбільш ефективного на сьогоднішній день препарату цільової терапії, а саме – компанія «Janssen Pharmaceutica», що випускає інкапсульований у ліпосоми доксорубіцин «Doxil».

Таблиця 4.6 – Оцінка характеристик за методом Шонфільда

Характеристика	Коефіцієнт вагомості характеристики	Оцінка характеристик	
		Наша продукція	«Doxil» від «Janssen Pharmaceutica»
Ціна	0,19	2	3
Якість готового продукту	0,27	5	5
Ефективність	0,27	5	4
Безпечність (низький прояв побічних ефектів)	0,27	5	4

З урахуванням коефіцієнту вагомості характеристики визначалася бальна оцінка кожної характеристики для нашої продукції і продукції конкурента (табл. 4.7).

Таблиця 4.7 – Бальна оцінка характеристик за методом Шонфільда

Характеристика	Бальна оцінка характеристик	
	Наша продукція	«Doxil» від «Janssen Pharmaceutica»
Ціна	$2 \cdot 0,19 = 0,38$	$3 \cdot 0,19 = 0,57$
Якість готового продукту	$5 \cdot 0,27 = 1,35$	$5 \cdot 0,27 = 1,35$
Ефективність	$5 \cdot 0,27 = 1,35$	$4 \cdot 0,27 = 1,08$
Безпечність (низький прояв побічних ефектів)	$5 \cdot 0,27 = 1,35$	$4 \cdot 0,27 = 1,08$

На підставі отриманих бальних оцінок побудовано графік порівняння характеристик нашої продукції з конкурентом (рис.4.2).

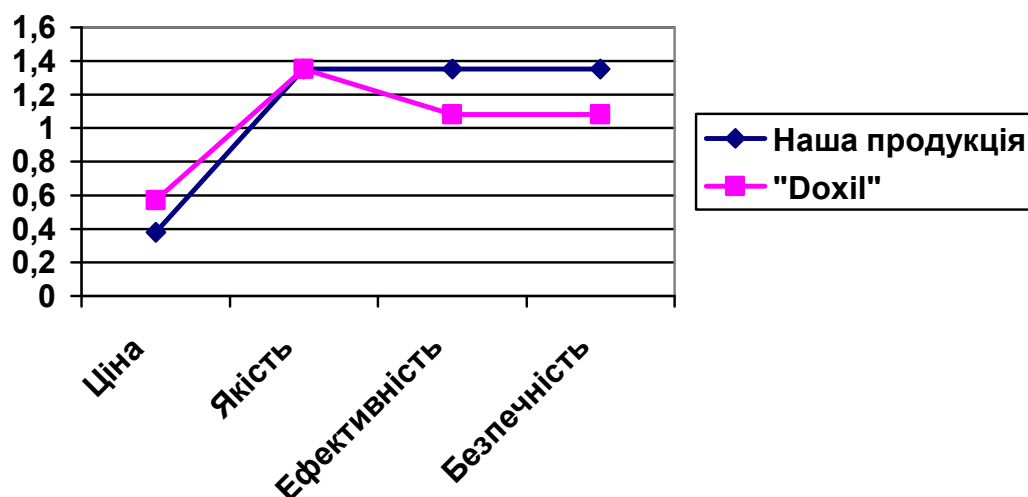


Рис. 4.2 – Порівняння конкурентних переваг підприємства з конкурентами

На основі аналізу ключових факторів успіху стартап-проекту визначалися можливі варіанти розвитку інноваційної ідеї (табл. 4.8).

Таблиця 4.8 – Варіанти розвитку стартапу

Варіант	Стислий опис можливого розвитку
1. Встановлення ціни на продукцію на рівні ціни конкурента	Приваблення споживачів на початкових етапах завдяки продажу більш ефективного та безпечного продукту за звичною ціною
2. Встановлення ціни на продукцію, вищої за продукцію конкурента, обумовлене інноваційністю розробки	Відсутність аналогів забезпечуватиме попит на продукцію, не зважаючи на високу вартість проте обмежуватиме потенціальну кількість споживачів

2.4. Визначення потенційних споживачів

Оскільки промислова фармацевтична компанія не проводитиме роздрібної торгівлі препаратами, у якості потенційних споживачів розглядалися лише юридичні особи – аптеки та онкологічні клініки (табл.4.9).

Таблиця 4.9 – Класифікація потенційних споживачів

Критерій	Значення
Юридична особа	
Форма власності	Державні та приватні

Продовження таблиці 4.9

КВЕД	86.22 Спеціалізована медична практика 47.73 Роздрібна торгівля фармацевтичними товарами в спеціалізованих магазинах
За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільні, багатoproфільні
За чисельністю персоналу	Малі, середні, великі
За сферою діяльності	Охорона здоров'я
За приналежністю капіталу і контролю	Національні, іноземні, спільні багатонаціональні
За віддаленістю органів управління	Національні, транснаціональні
За рівнем технологічної цілісності	Провідні, дочірні, філії
За долею іноземного капіталу	Без іноземних інвестицій, з іноземними інвестиціями, іноземні
За формуванням статутного капіталу	Унітарні, корпоративні
За роботою протягом року	Позасезонні
За географічним розташуванням на території України: – Регіон – Чисельність населення – Динаміка росту регіону – Правові обмеження торгівлі	У столиці та областних центрах Від 800 тис осіб Приріст населення 1,5-3% щорічно Згідно загального українського законодавства

Огляд основних груп потенційних споживачів та їх потреб наведено у табл. 4.10.

Таблиця 4.10 – Основні групи потенційних споживачів і їх потреби

Опис профілю цільової групи потенційних клієнтів	Готовність споживачів сприйняти продукт	Орієнтовний попит в межах цільової групи (сегменту)	Інтенсивність конкуренції в сегменті	Простота входу у сегмент
Онкологічні клініки та онкологічні відділення багатопрофільних клінік	Готові	Високий	Відсутня, враховуючи унікальність продукту	Середня складність
Аптеки	Готові	Високий	Відсутня, враховуючи унікальність продукту.	Середня складність

Визначені відомості щодо груп споживачів та їх потреб, було використано для формування паспорту потенційного клієнта (табл. 4.11)

Таблиця 4.11 – Паспорт потенційного клієнта

Характеристика	Значення
Організаційно-правова форма	Державна організація, приватна організація
Чисельність персоналу	25 – 300 осіб

Продовження таблиці 4.11

Розташування	Місто
Вид продукту, який потрібен даному споживачеві	Фармацевтичний препарат
Призначення придбаного товару	Роздрібний продаж, використання за призначенням
Потенційний обсяг споживання продукції	До 700 од./ місяць
Хто приймає рішення про придбання розробки	Завідувач лікарні, завідувач аптеки, начальник відділу організації та забезпечення державних закупівель

На основі аналізу потенційних споживачів було визначено бізнес-модель: B2B2C.

Проведено планування обсягу реалізації продукції у початковому періоді – на перший рік виробництва (табл. 4.12)

Таблиця 4.12 – Запланований обсяг реалізації стартап-продукту за перший рік виробництва

Період	Запланований обсяг, од.	Період	Запланований обсяг, од.
Січень 2022	3500	Липень 2022	50 000
Лютий 2022	7000	Серпень 2022	70 000
Березень 2022	12 000	Вересень 2022	80 000
Квітень 2022	18 000	Жовтень 2022	90 000
Травень 2022	25 000	Листопад 2022	100 000
Червень 2022	35 000	Грудень 2022	100 000
Всього		590 500 од. за рік	

2.5. Ціна інноваційної пропозиції на ринку

Оскільки дана бізнес-ідея знаходиться на етапі розробки, для обчислення проектної ціни продажу продукції було вирішено використовувати параметричний метод. Цей метод враховує вагомість якісних параметрів товару і оцінку цих параметрів споживачем.

Розрахунок ціни за параметричним методом здійснюється за формулою:

$$Ц_{\text{нової моделі}} = Ц_{\text{базової моделі}} \times \frac{\text{Балова оцінка нової моделі}}{\text{Балова оцінка базової моделі}}$$

де $Ц_{\text{нової моделі}}$ – ціна розробки, за якою компанія пропонуватиме її на ринку;

$Ц_{\text{базової моделі}}$ – ціна продукції конкурента;

Балова оцінка нової моделі – експертна оцінка (у балах) характеристик нової продукції при її застосуванні самим експертом в ході дослідного випробування, що виставляється з урахуванням коефіцієнту вагомості даної характеристики у переліку ключових характеристик товару;

Балова оцінка базової моделі – експертна оцінка (у балах) характеристик конкурентної продукції, яка вже існує на ринку з урахуванням коефіцієнту вагомості даної характеристики у переліку ключових характеристик товару.

Результати розрахунку проектної ціни продажу наведено у табл. 4.13.

Таблиця 4.13 – Розрахунок ціни продукту за параметричним методом

Продукт	Параметри						Ціна
	Якість		Ефективність		Безпечність		
	Бали	КВ*	Бали	КВ*	Бали	КВ*	оного балу = 32525 / (5*0,33 + 4*0,33+ 4*0,34) = 7512 грн
Конкурент («Doxil»)	5	0,33	4	0,33	4	0,34	32 525 грн
Наша продукція	5	0,33	5	0,33	5	0,34	7512 * (5*0,33 + 5*0,33 + 5*0,34) = 37 560 грн

* КВ – коефіцієнт вагомості параметру

Підсумки планування проектної ціни та обсягів продажу наведено у табл. 4.14

Таблиця 4.14 – Проектні ціна та обсяги продажу продукції

Планові обсяги продажу		Аналоги, прототипи	
Кількість, од.	Ціна, грн/од.	Кількість, од.	Ціна, грн/од.
590 500	37 560	3 350 000	32 525

Для планування залучення коштів розглянуто можливі джерела фінансування стартапу (табл. 4.15).

Таблиця 4.15 – Джерела фінансування для підприємства, що працює, за місцем їх виникнення

Запозичені	Власні
<p>1) бюджетні інвестиції, у т. ч.:</p> <ul style="list-style-type: none"> - державний бюджет; - місцеві бюджети; - гранти; <p>2) кредити фінансових установ;</p> <p>3) інші кошти, у т.ч.:</p> <ul style="list-style-type: none"> - кошти інвесторів - кошти громадських організацій. 	<p>1) вкладення витрат на удосконалення у собівартість продукції;</p> <p>2) збільшення собівартості нової продукції на вартість науково-дослідних і дослідно-конструкторських робіт;</p> <p>3) формування на підприємстві виробництва, фонду розвитку науки і техніки шляхом відрахувань чітко обумовленого відсотку з доходу або прибутку підприємства протягом всього періоду функціонування;</p> <p>4) амортизаційний фонд підприємства.</p>

2.6. Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту

Узагальнення основних принципів бізнес-моделі для впровадження запропонованої ідеї стартапу приведено у табл. 4.16.

Таблиця 4.16 – Схема бізнес-моделі стартап-проекту

Ключові партнери: - виробник бактеріального штаму <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 («Ardeypharm», Німеччина); - виробники обладнання для цехів («ОМЗ Мілеста-Україна»; «Solaris Biotech Solutions», Італія); - постачальник обладнання для лабораторій («BioLabTech», Україна); - виробники сировинних матеріалів («Хімтест Україна»; «Одеська біотехнологія»)	Ключові види діяльності: - виробництво фармацевтичних препаратів; - оптова торгівля готовою продукцією.	Клієнти: - онкологічні клініки; - аптеки.	Методи просування на ринку: - реклама в спеціалізованих ЗМІ; - інформування провізорів аптек та лікарів через медичних представників; - організація освітньо-наукових заходів; - розміщення детальної інформації на сайті компанії-виробника.
	Ключові ресурси: - людські; - фінансові; - матеріальні.	Проблеми споживачів, що вирішує розробка: Ефективне лікування онкологічних захворювань з низьким проявом побічних ефектів.	
	Ключові фактори успіху: - якість; - ефективність; -безпечність.		

Також складено карту бізнес-процесів виконання стартап-проекту (табл. 4.17)

Таблиця 4.17 – Карта бізнес-процесів виконання стартап-проекту

Стадія реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Орієнтовна тривалість процесу, год	Верхня межа фінансових витрат, грн
Розробка ідеї стартапу	Створення ідеї	Людські, фінансові	45	1 500
	Формування команди		90	1 500
	Аналіз ринку		90	10 000
	Проектування виробництва		180	40 000
	Розробка бізнес-плану		135	16 000
Реалізація ідеї стартапу	Реєстрація суб'єкта господарчої діяльності	Людські, фінансові	80	3000
	Реєстрація торгової марки		80	2700
	Отримання дозволу на побудову виробництва		110	3000
	Заклучення договору про намір з банком		60	3500
	Заклучення договору про намір з мережею збуту		45	2500
	Заклучення договору про намір з поставниками сировини та обладнання		45	2500

Продовження таблиці 4.17

Впровадження у виробництво	Запуск договорів	Людські, фінансові, матеріальні	45	1000
	Проведення будівничих робіт та технічного оснащення		540	17 800 000
	Проведення налаштувальних робіт		170	120 000
	Виготовлення першої партії продукції		72	250 000
	Сертифікація продукції та виробництва		90	3000
Масова реалізація	Проведення рекламної кампанії	Людські, фінансові	270	450 000
	Підготовка документації для участі у тендерних закупівлях		90	2500
Всього			2267	18 712 700

На основі карти бізнес-процесів виконання стартап-проекту, було проведено розподіл функцій між відповідальними за їх реалізацію працівниками та визначено кадрові потреби стартап-проекту на кожному із етапів (табл. 4.18).

Таблиця 4.18 – Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

Функції	Елементи			
	Розробник	Провідні спеціалісти	Виробничий персонал	Спеціалісти з контролю якості
Розробка ідеї	+			

Продовження таблиці 4.18

Формування команди	+	+		
Аналіз ринку	+			
Проектування виробництва	+			
Розробка бізнес-плану	+	+		
Реєстрація суб'єкта господарчої діяльності		+		
Реєстрація торгової марки		+		
Отримання дозволу на побудову виробництва		+		
Заклучення договору про намір з банком		+		
Заклучення договору про намір з мережею збуту		+		
Заклучення договору про намір з поставниками сировини та обладнання		+		
Запуск договорів	+	+		

Продовження таблиці 4.18

Проведення будівничих робіт та технічного оснащення			+	+
Проведення налаштувальних робіт			+	+
Виготовлення першої партії продукції			+	+
Сертифікація продукції та виробництва		+		+
Проведення рекламної кампанії		+		
Підготовка документації для участі у тендерних закупівлях		+		+

2.7. Ризики стартап-проекту та методи управління ними

Результати системного аналізу зовнішніх та внутрішніх ризиків бізнес-процесу наведено у табл. 4.19.

Таблиця 4.19 – Ризики інноваційної розробки

Назва процесу / стадії реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
Розробка ідеї стартапу	Розробка бізнес-плану	-	Неправильне планування бізнес-процесів
	Формування команди	Нестача спеціалістів внаслідок трудової міграції	Призначення на посади непрофесіональних працівників
Реалізація ідеї	Отримання дозволу на побудову виробництва	Відмова у дозволі на будівництво	-
	Заклучення договору про намір з банком	Несприятлива економічна обстановка в країні, що веде до зниження фінансування підприємств	Заклучення договору на не вигідних умовах
	Заклучення договору про намір з поставниками сировини та обладнання	Здорожчання сировини та обладнання	Нестача фінансових коштів на придбання якісного обладнання

Продовження таблиці 4.19

Впровадження у виробництво	Проведення будівничих робіт та технічного оснащення	Підвищення цін на роботи по будівництву	Неякісне виконання будівничих робіт
	Виготовлення першої партії продукції	-	Збої у роботі обладнання
Масова реалізація	Проведення рекламної кампанії	-	Неефективне рекламування продукції

Для кожно з ризиків оцінювалася імовірність настання та вплив на очікуваний результат (табл.4.20).

Таблиця 4.20 – Ризики інноваційної розробки та ймовірність їх настання

Види ризиків	Назва ризику	Ймовірність настання	Вплив на очікуваний результат
Зовнішні ризики			
Демографічний ризик	Нестача спеціалістів внаслідок трудової міграції	Середня	Високий
Політико-законодавчий ризик	Відмова у дозволі на будівництво	Низька	Високий

Продовження таблиці 4.20

Макроекономічний ризик	Несприятлива економічна обстановка в країні, що веде до зниження фінансування підприємств	Середня	Високий
	Здорожчання сировини та обладнання	Середня	Середній
	Підвищення цін на роботи по будівництву	Середня	Високий
Внутрішні ризики			
Управлінський ризик	Неправильне планування бізнес-процесів	Низька	Середній
	Призначення на посади непрофесіональн их працівників	Низька	Середній
Ризик зниження фінансових показників	Заклучення договору з банком на не вигідних умовах	Низька	Високий
Організаційний ризик	Нестача фінансових коштів на придбання якісного обладнання	Низька	Високий
Техніко-технологічний ризик	Неякісне виконання будівничих робіт	Середня	Високий
	Збої у роботі обладнання	Низька	Середній
Ризик зниження фінансових показників	Неефективне рекламування продукції	Середня	Середній

Результати оцінювання всіх ризиків за критеріями настання та впливом на очікуваний результат наведено у матриці оцінки ризиків (табл. 4.21).

Таблиця 4.21– Матриця оцінки ризиків

За впливом ризиків на очікуваний результат		За ймовірністю настання ризиків		
Критерій ризику		Низька ймовірність	Середня ймовірність	Висока ймовірність
	Числове значення	1	2	3
Високий рівень впливу	3	1) Відмова у дозволі на будівництво 2) Заключення договору з банком на не вигідних умовах 3) Нестача фінансових коштів на придбання якісного обладнання	1) Нестача спеціалістів внаслідок трудової міграції 2) Неприятлива економічна обстановка в країні, що веде до зниження фінансування підприємств 3) Підвищення цін на роботи по будівництву 4) Неякісне виконання будівничих робіт	

Продовження таблиці 4.21

Середній рівень впливу	2	1) Неправильне планування бізнес- процесів 2) Призначення на посади непрофесіональних працівників 3) Збої у роботі обладнання	1) Здорожчання сировини та обладнання 2) Неефективне рекламування продукції	
Низький рівень впливу	1			

Для усіх визначених ризиків розроблено план з управління ними (табл. 4.22).

Таблиця 4.22 – План заходів з управління ризиками

Назва ризику	Назва методу управління ризиком	Відповідальні виконавці	Період виконання / застосування методу	Очікувані результати від впровадження методів управління
Нестача спеціалістів внаслідок трудої міграції	Прийняття ризиків	Відділ кадрів	На усіх стадіях	Активний пошук спеціалістів, створення вигідних умов праці

Продовження таблиці 4.22

Відмова у дозволі на будівництво	Попередження ризику	Юрист	Стадія реалізації ідеї стартапу	Моніторинг правового середовища
Несприятлива економічна обстановка в країні, що веде до зниження фінансування підприємств	Прийняття ризику	Головний економіст	Стадія реалізації ідеї стартапу	Самострахування за рахунок резервних коштів
Здорожчання сировини та обладнання	Прийняття ризику	Головний економіст	Стадії впровадження у виробництво та масової реалізації	Покриття збитку з поточного доходу
Підвищення цін на роботи по будівництву	Прийняття ризику	Головний економіст	Стадія впровадження у виробництво	Залучення додаткових інвестицій для відновлення роботи
Неправильне планування бізнес-процесів	Попередження ризику	Директор	На усіх стадіях	Моніторинг економічного середовища, залучення спеціалістів з бізнес-планування
Призначення на посади непрофесійних працівників	Попередження ризику	Відділ кадрів	На усіх стадіях	Детальне вивчення інформації, тестування знань та навичок працівників

Продовження таблиці 4.22

Заклучення договору з банком на не вигідних умовах	Ухилення від ризику	Головний економіст	Стадія реалізації ідеї стартапу	Відмова від прийняття ризикованих проектів, рішень
Нестача фінансових коштів на придбання якісного обладнання	Прийняття ризику	Головний економіст	Стадія реалізації ідеї стартапу	Самострахування за рахунок резервних коштів
Неякісне виконання будівничих робіт	Ухилення від ризику	Спеціаліст з якості	Стадія впровадження у виробництво	Відмова від ненадійних партнерів та постачальників
Збої у роботі обладнання	Передача ризику	Головний технолог	Стадії впровадження у виробництво та масової реалізації	Отримання гарантій на роботу обладнання від виробників
Неефективне рекламування продукції	Передача ризику	Маркетолог	Стадія масової реалізації	Аутсорсинг ризику

ВИСНОВКИ

1. Методами порівняльної геноміки показано, що бактерії, які накопичуються в пухлинах, є потенційними продуцентами БМН. Дослідження показали, що усі 15 штамів, для яких це явище досліджене експериментально, є продуцентами БМН. Зроблено висновок, що бактеріальна колонізація пухлин обумовлена магнітодипольною взаємодією між БМН пухлинних та бактеріальних клітин.
2. Методами порівняльної геноміки було виявлено продуцентів БМН серед штамів пробіотичних бактерій.
3. Експериментально підтверджено наявність БМН у клітинах *Escherichia coli* Nissle 1917 методами ACM та MCM.
4. Досліджено вплив хелату заліза та зовнішнього магнітного поля на посилення магнітних властивостей *Escherichia coli* Nissle 1917. Виявлено, що вирощування *Escherichia coli* Nissle 1917 на поживному середовищі з додаванням хелату заліза та під впливом зовнішнього магнітного поля підвищує інтенсивність процесів біомінералізації БМН. Показано, що інтенсивність росту клітин *E. coli* Nissle 1917 змінюється тільки під впливом зовнішнього постійного магнітного поля і є вищою на 14%, ніж вирощених на стандартному середовищі та на середовищі з додаванням хелату заліза.
5. Створено магнітокеровану систему адресної доставки ліків на основі *Escherichia coli* Nissle 1917 та ліпосом для терапії раку.
6. За результатами роботи проведено розробку стартап-проекту.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

Номер по порядку	Скорочена назва посилання	Повна назва посилання
1	Горобець <i>Вісн. Нац. чернів. унів.</i> 2013	Горобець С.В. Генетична основа фундаментального механізму біосинтезу наномагнетиту у магнітотаксисних та анаеробних мікроорганізмів / С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, Ю.М. Чиж, І.В. Дем'яненко // Вісник Національного чернівецького університету. Біологічні системи. – 2013. – 5(2). – с.274 – 280
2	Горобець 2018	Функціональні біо- та наноматеріали медичного призначення: монографія / С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, П.П. Горбик, І.В. Уварова. – Київ: Видавничий дім «Кондор», 2018. – 480 с.
3	Горобець 2019	Горобець С.В. Дослідження біогенних магнітних наночастинок в культурах гліоми людини U-251 / Горобець С.В., Дарменко Є.А., Баб'юк М.Б., Заїка Л.А., Шарай І.В. //«Біотехнологія ХХІ століття»: матеріали ХІІІ Всеукраїнської науковопрактичної конференції (Київ, 19 квітня 2019). – Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2019. – с.25.
4	Ленглер 2005	Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т1./ Под ред. Й. Ленглера, Г. Древса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. – 342 с

5	Маклакова 2018	Маклакова С.Ю. Лиганды асиалогликопротеинового рецептора и конъюгаты на их основе с терапевтическими и диагностическими агентами: дис ... к.х.н.: 02.00.03. Москва, 2018.
6	Никитин <i>Леч. врач</i> 2017	Никитин, Е.А. «Волшебные пули»: моноклональные антитела в онкологии (обзор) / Е.А. Никитин, О.И. Глазкова // <i>Лечащий врач</i> . — 2017. — № 6. — С.8—11.
7	Підлісна 2019	Економічна частина магістерської дисертації: розроблення стартап-проекту: [Електронний ресурс]: навч. посіб. для студ. спеціальності 151 «Автоматизація та комп'ютерно-інтегровані технології» та спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія» / О.А. Підлісна, Ю.В. Тюленєва ; КПІ ім. Ігоря Сікорського. – Електронні текстові дані (1 файл: 0,2 Мбайт). – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2019. – 32 с.
8	Постнов <i>Биотехносфера</i> 2013	Постнов В.Н. Наноразмерные носители для доставки лекарственных препаратов / Постнов В.Н., Наумышева Е. Б., Королев Д.В., Галагудза М. М.// <i>Биотехносфера</i> . – 2013. – №6. – с.30.
9	Пятаев <i>Поволж. онк. весн.</i> 2012	Пятаев Н.А. Таргетный транспорт противоопухолевых химиопрепаратов: современные технологии и перспективы развития / Н.А. Пятаев, Г.Г. Мельцаев, П.И. Скопин, О.В. Минаева, С.А. Щукин // <i>Поволжский онкологический весник</i> . – 2012.

		– № 2. – с. 60-71.
10	Фролов <i>Вестник КузГТУ</i> 2012	Фролов А. В. Области применения диальдегиддекстрана и исследование его свойств / Фролов А. В., Беляев В. Н., Бычин Н. В. // Вестник КузГТУ. - 2012. - №1(89).
11	Чехун <i>Наноструктурное материаловедение</i> 2011	Чехун В.Ф. Магніточутливі наноструктури ендогенного походження у клітинах карциноми Ерліха / В.Ф. Чехун, С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, І.В. Дем'яненко // Наноструктурное материаловедение – 2011. – № 2, с. 102 – 109.
12	Чиж 2017	Чиж Ю.М. Біотехнології на основі магнітомічення мікроорганізмів: автореф. дис. канд. техн. наук / Чиж Ю.М. – К., 2017. – 159 с.
13	Шкурूपий 2011	Способ получения окисленного декстрана: пат. RU 2618341. Заяв.: 2010.04.26. Опубл.: 2011.08.20. Бюл. № 21.
14	Anish <i>Oncology</i> 2016	Anish T. Antibody–drug conjugates for cancer therapy / Anish T., Beverly A., Raffit H. [et al.] // Oncology. – 2016. – №6. – с. 254-262.
15	Arakaki <i>Soc. Interface</i> 2008	Arakaki A. Formation of magnetite by bacteria and its application / A. Arakaki, H. Nakazawa, M. R. Nemoto // Soc. Interface. – 2008. – V.5. – P. 977
16	Baban Bioeng Bug 2010	Baban C.K. Bacteria as vectors for gene therapy of cancer / C.K. Baban, M. Tangney, M. Cronin [et al.] // Bioeng Bug – 2010. – 1(6).

		– p.385-94.
17	Brem <i>J. R. Soc. Interface</i> 2006	Brem F. Magnetic iron compounds in the human brain: a comparison of tumour and hippocampal tissue / F.Brem, A.M. Hirt, M. Winklhofer, K.Frei, Y. Yonekawa, H.-G. Wieser, J.Dobson // <i>Journal of the royal society interface</i> – 2006. – №3. – p.833–841.
18	Bettegowda <i>Natl Acad Sci USA</i> 2003	Bettegowda C, Dang LH, Abrams R, Huso DL, Dillehay L, Cheong I, et al. Overcoming the hypoxic barrier to radiation therapy with anaerobic bacteria. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> . 2003;100:15083–15088. DOI: 10.1073/pnas.2036598100
19	Buttaro <i>Current Gene Therapy</i> 2010	Buttaro C, Fruehauf JH. Engineered E. coli as Vehicles for Targeted Therapeutics. <i>Current Gene Therapy</i> . 2010; 10: 27. DOI: 10.2174/156652310790945593
20	Cheng <i>Cell</i> 2004	Cheng, Y. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex / Y. Cheng, O. Zak, P. Aisen [et al.] // <i>Cell</i> . — 2004. — № 6. — p.565—576.
21	Chong <i>Acta Pharm Sinica B</i> 2019	Chong L. Recent progress in drug delivery / Chong L. // <i>Acta Pharmaceutica Sinica B</i> . – 2019. – №9. – p.1145-1162. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.08.003
22	Chow <i>Sci Trans Med</i> 2013	Chow E. K.-H. Cancer Nanomedicine: From Drug Delivery to Imaging / Chow E. K.-H., Dean M. // <i>Science Translational Medicine</i> . –

		2013. - №5, p.216-218. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005872
23	Comstock <i>Oncogene</i> 2013	Comstock, C. Targeting cell cycle and hormone receptor pathways in cancer / Comstock, C., Augello, M., Goodwin, J. et al. // <i>Oncogene</i> . – 2013. – №32. – p.5481–5491. DOI:10.1038/onc.2013.83
24	Castellarin <i>Genome Res</i> 2012	Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, et al. <i>Fusobacterium nucleatum</i> infection is prevalent in human colorectal carcinoma. <i>Genome Res</i> . 2012;22(2):299–306. DOI:10.1101/gr.126516.111
25	Cronin <i>Cancer Gene Ther</i> 2012	Cronin M, Stanton R, Francis K, et al. Bacterial vectors for imaging and cancer gene therapy: a review. <i>Cancer Gene Ther</i> . 2012; 19: 731–740. DOI: 10.1038/cgt.2012.59
26	Cronin <i>Mol Ther</i> 2010	Cronin M, Morrissey D, Rajendran S, et al. Orally administered bifidobacteria as vehicles for delivery of agents to systemic tumors. <i>Mol Ther</i> . 2010;18(7):1397–1407. DOI: 10.1038/mt.2010.59
27	Dharap <i>PNAS</i> 2005	Dharap S. S. Tumor-specific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH peptide / S. S. Dharap, Y. Wang, P. Chandna et al. // <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i> . – 2005.- №102. - pp. 12962–12967,
28	Galmbacher <i>PloS ONE</i> 2010	Galmbacher K, Heisig M, Hotz C, Wischhusen

		J, et al. Shigella Mediated Depletion of Macrophages in a Murine Breast Cancer Model Is Associated with Tumor Regression. PloS ONE. 2010; 5: e9572. DOI: 10.1371/journal.pone.0009572.
29	Goldufsky <i>J of med microbiology</i> 2015	Goldufsky J, Wood S, Hajihossainlou B. Pseudomonas aeruginosa exotoxin T induces potent cytotoxicity against a variety of murine and human cancer cell lines. Journal of medical microbiology. 2015; 2: 164-173. DOI: 10.1099/jmm.0.000003-0.
30	Gorobets <i>Functional Materials</i> 2014	Gorobets O.Yu. Biomineralization and synthesis of biogenic magnetic nanoparticles and magnetosensitive inclusions in microorganisms and fungi / O. Yu. Gorobets, S.V. Gorobets, L.V. Sorokina // Functional Materials. – 2014. – No4. – P. 15-21. http://dx.doi.org/10.15407/fm21.04.427 .
31	Gorobets <i>Functional Mater</i> 2012	Gorobets SV. Function of biogenic magnetic nanoparticles in organisms / Gorobets SV, Gorobets OYu. // Functional Mater. – 2012. – №19(1). – p.18-26. DOI: 10.1002/adfm.v22.24
32	Gorobets <i>Inn Biosys and Bioeng</i> 2018	Gorobets SV. Producers of Biogenic Magnetic Nanoparticles among Pathogenic and Opportunistic Microorganisms / Gorobets SV, Gorobets OYu, Butenko KO // Innovative Biosystems and Bioengineering. – 2018. – №2. – p.33-41. DOI: 10.20535/ibb.2018.2.1.127260

33	Gorobets Dekker <i>ENN</i> 2014	Gorobets O.Yu. Biogenic magnetic nanoparticles: Biomineralization in prokaryotes and eukaryotes / O.Yu. Gorobets, S.V. Gorobets, Yu.I. Gorobets // Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology (3rd Edition). – New York: CRC Press. – 2014. – P. 300 – 308.
34	Gorobets 2013	Gorobets SV. The genetic basis of a fundamental mechanism in the biosynthesis nanomagnetite magnetotactic and an aerobic microorganisms / Gorobets SV, Gorobets OYu, Chyzh YuM, Demianenko IV. // Visnyk Natsional'noho Chernivets'koho Universytetu. Biologichni Systemy. – 2013. – №5(2). – p.274-80.
35	Festino <i>Springer</i> 2018	Festino L. Side Effects of Cancer Immunotherapy with Checkpoint Inhibitors / Festino L., Ascierto P.A. // Oncoimmunology. Springer. – 2018. – №5. – p.132-139. DOI https://doi.org/10.1007/978-3-319-62431-0_33
36	Filho <i>BBA</i> 2018	Filho C.P. Multimodal highly fluorescent-magnetic nanoplatfrom to target transferrin receptors in cancer cells / C.P. Filho, M.P.Cabrera, A.Cardoso [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta. – 2018. – №12. – p. 2788-2796.
37	Filatova <i>RUSS CHEM REV</i>	Filatova L. Yu. Targeted delivery of anti-tuberculosis drugs to macrophages: targeting

	2018	mannose receptors / L Yu Filatova, N L Klyachko, E V Kudryashova // RUSS CHEM REV. – 2018. – №87 (4) . – p. 374–391. DOI: https://doi.org/10.1070/RCR4740
38	Flickinger <i>Vaccines</i> 2018	Flickinger JC Jr, Rodeck U, Snook AE. <i>Listeria monocytogenes</i> as a Vector for Cancer Immunotherapy: Current Understanding and Progress. <i>Vaccines</i> (Basel). 2018; 6(3): 48. DOI: 10.3390/vaccines6030048
39	Frankel 2007	Frankel R. Magnetoreception and magnetosomes in bacteria: Magnetoaerotaxis / Frankel R., Williams T., Bazylinski D. 2007. p.2-24.
40	Friedlos <i>Clin Cancer Res.</i> 2008	Friedlos F, Lehouritis P, Ogilvie L, Hedley D, et al. Attenuated Salmonella Targets Prodrug Activating Enzyme Carboxypeptidase G2 to Mouse Melanoma and Human Breast and Colon Carcinomas for Effective Suicide Gene Therapy. <i>Clin Cancer Res.</i> 2008; 14: 4259-4266. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4800
41	Haiyun <i>Adv funct materials</i> 2010	Haiyun M. et al. Polymer scaffolds for small-diameter vascular tissue engineering. / // <i>Advanced functional materials</i> – 2010. – № 20(17). – p.2833–2841.
42	Heppner <i>Acta Neurochir</i> 1978	Heppner F, Mose JR. The liquefaction (oncolysis) of malignant gliomas by a non pathogenic <i>Clostridium</i> . <i>Acta Neurochir</i> (Wien) 1978;42:123–125. DOI: 10.1007/BF01406639

43	Hurria <i>J Clin Oncol</i> 2016	Hurria A. Validation of a Prediction Tool for Chemotherapy Toxicity in Older Adults With Cancer / Hurria A, Mohile S, Gajra A, et al. // J Clin Oncol. – 2016. – №34(20) . –p.2366–2371. DOI:10.1200/JCO.2015.65.4327
44	Ikehara <i>Bioelectromagnetics</i> 2002	Ikehara T. Effects of a time varying strong magnetic field on release of cytosolic free Ca ²⁺ from intracellular stores in cultured bovine adrenal chromaffin cells / Ikehara T, Park K, Yamaguchi H, et al. // Bioelectromagnetics. - 2002. - №23(7). – p.505-15. DOI: 10.1002/bem.10043
45	Ivanenkov <i>Russ. Chem. Rev.</i> 2017	Ivanenkov Y.A. Development of liver cell-targeted drug delivery systems: experimental approaches / Ivanenkov Y.A., Maklakova S.Yu., Beloglazkina E.K., et al. // Russ. Chem. Rev. – 2017. – №. 86. – p.750-776.
46	Jain <i>Cur. drug delivery</i> 2014	Jain V. Nanomedicines based drug delivery systems for anti-cancer targeting and treatment / Jain V., Jain S., Mahajan S.C. // Current drug delivery. – 2014. – №12. – p. 156-172.
47	Johnston <i>JNCI</i> 2015	Johnston S. Enhancing Endocrine Therapy for Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer: Cotargeting Signaling Pathways / Stephen R. D. Johnston // JNCI: Journal of the National Cancer Institute. – 2015. – p. 213-220. https://doi.org/10.1093/jnci/djv212
48	Lee <i>Cancer Gene Therapy</i> 2005	Lee C, Wu C, Shiau A. Systemic administration of attenuated <i>Salmonella choleraesuis</i> carrying

		thrombospondin-1 gene leads to tumor-specific transgene expression, delayed tumor growth and prolonged survival in the murine melanoma model. <i>Cancer Gene Therapy</i> . 2005; 12: 175-184. DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.01.008
49	Lin <i>National Science Review</i> 2019	Lin W. On the origin of microbial magnetoreception / <u>Wei Lin</u> , <u>Joseph L Kirschvink</u> , <u>Greig A Paterson</u> , et. al // <i>National Science Review</i> . – 2019. – №3. – p.230-342. https://doi.org/10.1093/nsr/nwz065
50	Li <i>J of the Nat Cancer Institute</i> 2008	Li Z. A genetically enhanced anaerobic bacterium for oncopathic therapy of pancreatic cancer / Li Z, Fallon J, Mandeli J, Wetmur J, Woo SL // <i>Journal of the National Cancer Institute</i> . 2008. – №100(19). – p.1389–1400. DOI: 10.1093/jnci/djn308.
51	Liu <i>Theranostics</i> 2016	Liu D. The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential / Liu D, Yang F, Xiong F, Gu N. // <i>Theranostics</i> . – 2016. – №6(9). – p.1306–1323. doi:10.7150/thno.14858
52	Matsunaga <i>Trends Biotechnol</i> 2007	Matsunaga T. Molecular analysis of magnetotactic bacteria and development of functional bacterial magnetic particles for nano-biotechnology / T. Matsunaga, T. Suzuki, M. Tanaka // <i>Trends Biotechnol</i> . – 2007. – V.25. – P.182
53	Maverakis <i>Acta Derm Venereol</i> 2015	Maverakis E. Metastatic melanoma - a review of current and future treatment options / E. Maverakis, L.A. Cornelius, G.M. Bowen, et al. // <i>Acta Derm Venereol</i> . – 2015. – № 95 (5). –

		p.516–524. DOI:10.2340/00015555-2035
54	Medvedeva <i>Biomed Khim</i> 2006	Medvedeva N.V. Nanobiotechnology and nanomedicine / N.V. Medvedeva, O.M. Ipatova, Iu.D. Ivanov [et al.] // <i>Biomed Khim.</i> – 2006. – Vol. 52, № 6. – P.529—546.
55	Mikeshyna <i>Acta Physica Polonica</i> 2018	Mikeshyna H. I. Influence of biogenic magnetic nanoparticles on the vesicular transport / H. I. Mikeshyna, Y.A. Darmenko, O. Yu. Gorobets, S.V. Gorobets, I. V. Sharay, O.M. Lazarenko // <i>Acta Physica Polonica A.</i> – 2018. – Vol. 133. – № 3. – P.731-733.
56	Muz <i>Hypoxia</i> 2015	Muz B. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy / Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK // <i>Hypoxia (Auckl).</i> – 2015. – №3. – p.83–92. DOI:10.2147/HP.S93413
57	Newhauser <i>Front Oncol</i> 2016	Newhauser WD. A Review of Radiotherapy-Induced Late Effects Research after Advanced Technology Treatments / Newhauser WD, Berrington de Gonzalez A, Schulte R, Lee C // <i>Front Oncol.</i> – 2016. – №6. – p.13. DOI: 10.3389/fonc.2016.00013
58	Patyar <i>J. of Biomed. Science</i> 2010	Patyar S. Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy / S. Patyar, R. Joshi, D. Prasad, Prakash // <i>Journal of Biomedical Science.</i> – 2010. – V. 17. – P.21 – 28
59	Pershina A.G <i>Бюл.</i>	Першина А. Г. Использование магнитных

	<i>сиб. мед.</i> 2008	наночастиц в биомедицине / А.Г. Першина, А.Э. Сазонов, И. В. Мильто // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – №2. – с. 70-78.
60	Rahman <i>Int. J. Nanomedicine</i> 2007	Rahman, A.M. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation / A.M. Rahman, S.W. Yusuf, M.S. Ewer // <i>Int. J. Nanomedicine</i> . – 2007. – № 4. – p.567—583.
61	Ramos <i>Oncogene</i> 2015	Ramos P. Mechanism-based cancer therapy: resistance to therapy, therapy for resistance / Ramos P., Bentires-Alj M. // <i>Oncogene</i> . – 2015.- №34. – p. 3617–3626. DOI:10.1038/onc.2014.314
62	Salmanpour <i>Scientia Agriculturae Bohemica</i> 2018	Salmanpour I. Iron Chelate and Rhizobacteria Changed Growth, Grain Yield, and Physiological Characteristics in Maize / Salmanpour I., Ghorbani H., Asghari, H.R. // <i>Scientia Agriculturae Bohemica</i> . – 2018. - №49. – p.245-254. DOI:10.2478/sab-2018-0031.
63	Shabo <i>Springer</i> 2011	Shabo I. Expression of Macrophage Antigens by Tumor Cells / Shabo I., Svanvik J. // <i>Springer</i> . – 2011. – №950. – p.340-349. DOI https://doi.org/10.1007/978-94-007-0782-5_7

64	Stavinoha <i>Bioengineering</i> 2018	Stavinoha PL. Neurocognitive and Psychosocial Outcomes in Pediatric Brain Tumor Survivors / Stavinoha PL, Askins MA, Powell SK, et al. // <i>Bioengineering</i> (Basel). – 2018. – №5(3). – p.73-79. DOI:10.3390/bioengineering5030073
65	Singh <i>Int J Nanomedicine</i> 2017	Singh SK. Drug delivery approaches for breast cancer / Singh SK, Singh S, Lillard JW Jr, Singh R. // <i>Int J Nanomedicine</i> . – 2017. – №12. – p. 6205–6218. DOI:10.2147/IJN.S140325
66	Sun <i>Bioconjugate Chemistry</i> 2008	Sun H. K. LHRH receptor-mediated delivery of siRNA using polyelectrolyte complex micelles self-assembled from siRNA-PEGLHRH conjugate and PEI / H. K. Sun, H. J. Ji, H. L. Soo, et al. // <i>Bioconjugate Chemistry</i> . – 2008. - №11. - p. 2156–2162.
67	Sutradhar <i>ISRN Nanotechnology</i> 2014	Sutradhar K. Nanotechnology in Cancer Drug Delivery and Selective Targeting / Sutradhar K. // <i>ISRN Nanotechnology</i> . – 2014. – №10. – p1-12. DOI:10.1155/2014/939378.
68	Subotic <i>European Urology Supplements</i> 2012	Subotic S. Surgical treatment of localised renal cancer / S. Subotic, S. Wyler, A. Bachmann // <i>European Urology Supplements</i> . – 2012. – №11(3). – p.60–65. DOI: 10.1016/j.eursup.2012.04.002. ISSN 1569-9056
69	Stover <i>Curr Protoc. Essential Lab. Tech</i> 2017.	Stover N. A. Using NCBI BLAST / Stover N. A., Cavalcanti A. R. O. // <i>Curr. Protoc. Essential Lab. Tech</i> . 2017. №14.– p. 11-24. doi: 10.1002/cpet.8

70	Tangney <i>Bioengineered bugs</i> 2010	Tangney M, van Pijkeren JP, Gahan G. The use of <i>Listeria monocytogenes</i> as a DNA delivery vector for cancer gene therapy. <i>Bioengineered bugs</i> . 2010; 1(4): 284–287. DOI: 10.4161/bbug.1.4.11725
71	Tech <i>ScienceDaily</i> 2018	Tech V. Bacteria-based drug delivery system that outperforms conventional methods / V.Tech // <i>ScienceDaily</i> . - 2018.
72	Ullrich <i>J Bacte-riol</i> 2005	Ullrich S. A hypervariable 130-kilobase genomic region of <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> comprises a magnetosome island which undergoes frequent rearrangements during stationary growth / Ullrich S, Kube M, Schubbe S, Reinhardt R, Schuler D // <i>J Bacte-riol</i> . 2005;187(21):7176-84. DOI: 10.1128/JB.187.21.7176-7184.2005
73	Vergote <i>Ther Adv Med Oncol</i> 2015	Vergote I. Vintafolide: a novel targeted therapy for the treatment of folate receptor expressing tumors / Vergote I, Leamon CP. // <i>Ther Adv Med Oncol</i> . – 2015. – №7(4). – p. 206–218. doi:10.1177/1758834015584763
74	Wagner <i>Database of Systematic Reviews</i> 2017	Wagner AD. Chemotherapy for advanced gastric cancer. / Wagner AD, Syn NLX, Moehler M, Grothe W, Yong WP, Tai BC, Ho J, Unverzagt S. // <i>Cochrane Database of Systematic Reviews</i> . – 2017. – №8. DOI: 10.1002/14651858.CD004064.pub4.
75	Wishard <i>Nucl Acids Res</i> 2007	Wishard D. S. HMDB: the Human Metabolome Database / David S. Wishart, Dan Tzur, Craig

		Knox, Roman Eisner // Nucleic Acids Research. – 2007. – №35. – P. 521-526.
76	Zhao <i>J Nanomed Nanotechnol</i> 2018	Zhao N. Advances in delivery systems for doxorubicin / Zhao N, Woodle MC, Mixson AJ. // J Nanomed Nanotechnol. – 2018. – №9(5). – p.519-526. doi:10.4172/2157-7439.1000519